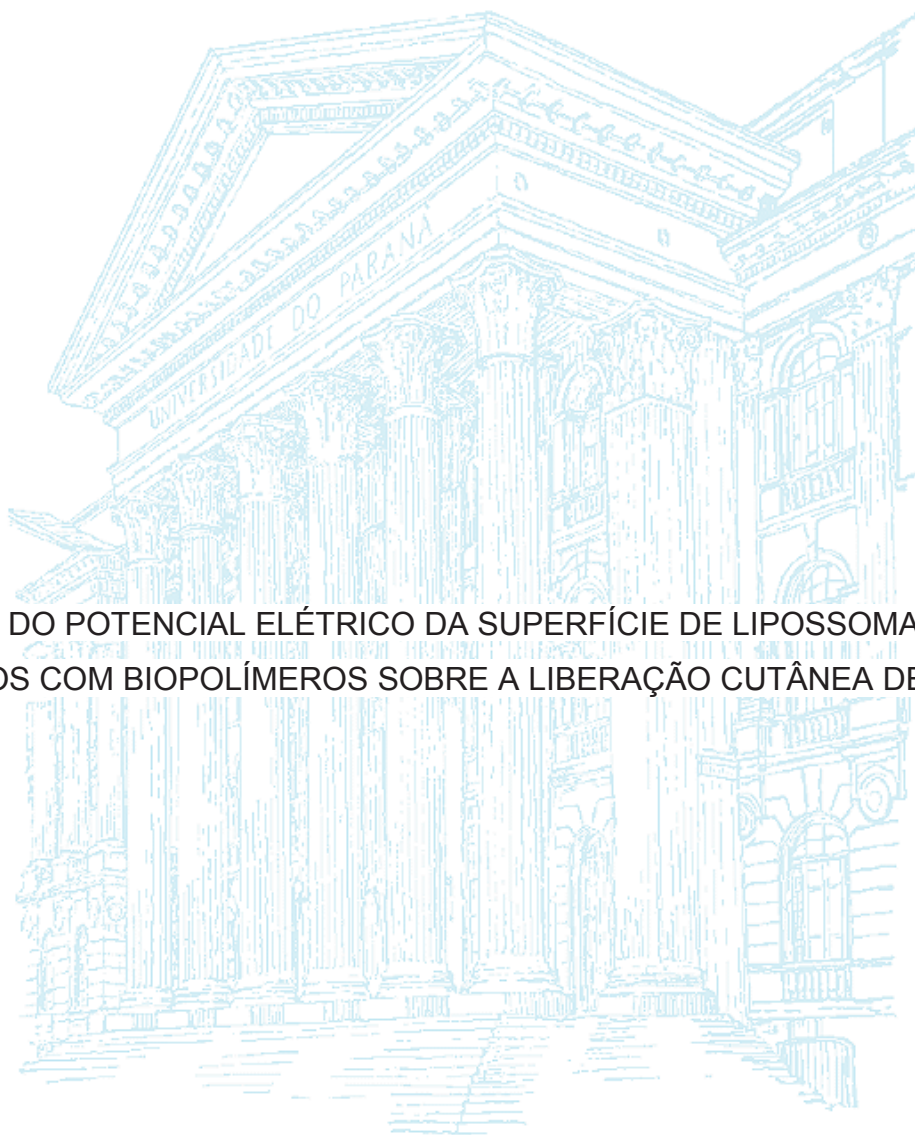


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA PEREIRA PARCHEN

EFEITO DO POTENCIAL ELÉTRICO DA SUPERFÍCIE DE LIPOSSOMAS
REVESTIDOS COM BIOPOLÍMEROS SOBRE A LIBERAÇÃO CUTÂNEA DE EGF



CURITIBA

2019

GABRIELA PEREIRA PARCHEN

EFEITO DO POTENCIAL ELÉTRICO DA SUPERFÍCIE DE LIPOSSOMAS
REVESTIDOS COM BIOPOLÍMEROS SOBRE A LIBERAÇÃO CUTÂNEA DE EGF

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde,
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Florencio Maluf

CURITIBA

2019

Parchen, Gabriela Pereira

Efeito do potencial elétrico da superfície de lipossomas revestidos com biopolímeros sobre a liberação cutânea de EGF [recurso eletrônico] / Gabriela Pereira Parchen – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Rilton Alves de Freitas

Coorientadora: Professora Dra. Daniela Florencio Maluf

1. Lipossomas. 2. Revestimento polimérico. 3. Permeação cutânea. I. Freitas, Rilton Alves de. II. Maluf, Daniela Florencio. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1901




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

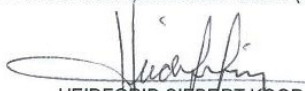
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GABRIELA PEREIRA PARCHEN** intitulada: **Efeito do potencial elétrico da superfície de lipossomas revestidos com biopolímeros sobre a liberação cutânea de EGF**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 25 de Fevereiro de 2019.


RILTON ALVES DE FREITAS

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


HEIDEGRID SIEBERT KOOP

Avaliador Externo (FF)


FÁBIO SEIGIMURAKAMI

Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas, pela confiança ao me entregar este trabalho, por ser um professor maravilhoso, rir das minhas histórias e principalmente por não ter desistido de mim.

À Prof^a. Dr^a. Daniela Florencio Maluf, por ter acreditado na minha capacidade e estar comigo na minha iniciação no mundo da docência.

À Dr^a. Heidegrid Siebert Koop, por toda paciência e ajuda, das orelhas às bolhas, me fazendo ter calma e torcendo pelos meus experimentos.

A aluna de iniciação científica Isabella Ricardo de Borja e Silva por fazer parte deste trabalho e pela ajuda nas horas críticas.

A todos os laboratórios da UFPR que abriram suas portas para o uso de equipamentos essenciais a esse trabalho: ao Laboratório de Carboidratos Vegetais e à Prof^a. Dr^a. Joana Léa Meira Silveira pelo uso da célula de Franz, ao Laboratório de Matriz Extracelular (LME), pelo uso do fluorímetro, ao Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais (LECOSIN) e ao Prof. Dr. Francisco de Assis Marques, pelo uso do rotaevaporador. Ao Centro de Estudos em Biofarmácia (CEB) e ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, pelo uso do CLAE e do FTIR. Ao Laboratório de Oxidações, pelo uso do fluorímetro e ao Departamento de Química da UFPR, pela utilização do espectrofotômetro de UV.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN) e seus técnicos, pela realização das análises de RMN e à Dr^a. Mariana Mazetto pelo auxílio na preparação das amostras e interpretação dos dados de RMN e SEC.

Ao frigorífico Thoms, pelo fornecimento das peles suínas para este trabalho.

Aos amigos do BioPol, que tornaram as dificuldades mais fáceis e engraçadas e a cada dia contribuíram mais para minha evolução como cientista e principalmente como pessoa. À Bianca e o Lucas, pelos passeios, amizade e companheirismo. À Fernanda, por seu bom humor e prontidão para ajudar, sendo a melhor surpresa que recebi.

À Msc. Joslaine Jacumazo por ser minha professora, meu guia, minha amiga e minha mãe durante estes dois anos.

Ao Msc. João Pedro Elias Machado, por me trazer paz em dias ruins e compartilhar sorrisos em dias bons.

À CAPES, pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa.

RESUMO

Lipossomas são nanoestruturas usadas como carreadores de fármacos e também como agentes de vetorização cutânea de ativos em processos inflamatórios ou associados ao envelhecimento cutâneo. Tais estruturas, passíveis de absorção cutânea são vantajosas quando aplicadas por esta via por não sofrerem metabolismo de primeira passagem e por reduzirem a ocorrência de efeitos colaterais. Entretanto, o estrato córneo, camada mais externa da pele, atua como uma barreira que limita significativamente a permeação de ativos pelas camadas da pele. Assim, várias estratégias para aumentar a permeação cutânea são desenvolvidas, entre elas modificação da composição química, tamanho e alteração do potencial elétrico da interface. Dentre os polímeros, o alginato de sódio e a quitosana são polissacarídeos com caráter aniônico e catiônico, respectivamente, e apresentam potencial aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos, bem como podem funcionar como adjuvantes na permeação cutânea de ativos lipossomados. Portanto, o objetivo deste trabalho é caracterizar lipossomas catiônicos e revestidos com alginato e alginato-quitosana, verificando a eficiência da permeação cutânea *in vitro* frente a alteração do potencial de superfície. Para isso, os lipossomas (Lip) foram produzidos a partir do lipídeo catiônico brometo de dioctadecil dimetil amônio (DODAB) e 1,2 dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) (LipD) por reidratação de filme lipídico. A caracterização dos polímeros foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) e a presença dos ambientes hidrofóbicos da estrutura lipossomal foi demonstrada por sonda de pireno. O revestimento polimérico foi realizado por *Layer-by-Layer*, com uma camada de alginato de sódio e em seguida, com quitosana, para formar uma dupla camada polimérica, originando as estruturas de lipossomas revestidos com algonaLip-A/LipD-A e Lip-C/LipD-C, respectivamente, onde foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho e determinação do potencial zeta (potencial ζ), cujos valores obtidos foram de $+79 \pm 0,4$ e $62 \pm 1,5$ mV para Lip/LipD, $-52 \pm 0,2$ e $-68 \pm 0,3$ mV para Lip-A/LipD-A e $39 \pm 0,3$ mV e $48 \pm 0,3$ mV para Lip-C/LipD-C, respectivamente. A determinação do diâmetro dos lipossomas e lipossomas revestidos foi determinada por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Lip, LipA e LipC apresentaram diâmetro de 66 ± 19 , 104 ± 13 e 204 ± 105 nm, respectivamente, enquanto com a presença de DOPE, os diâmetros foram de 34 ± 4 , 278 ± 36 e 216 ± 96 nm para LipD, LipD-A e LipD-C, respectivamente. A morfologia e topografia dos lipossomas, determinado por microscopia de força atômica (AFM) foi de 56 ± 8 , 125 ± 68 e 151 ± 24 nm para os lipossomas sem DOPE e 63 ± 8 , 172 ± 30 e 165 ± 32 nm para lipossomas com DOPE. A alteração do potencial ζ , bem como o aumento de tamanho apresentado pelas estruturas indicam que o revestimento polimérico foi bem-sucedido. Após o encapsulamento do fator de crescimento epidermal (EGF), foi quantificada a eficiência de incorporação nos lipossomas pelo método indireto, que apresentou um aumento de 20 para 55% quando revestidos com os polímeros. Quando avaliado o efeito do revestimento sobre a permeação cutânea utilizando uma sonda de fluoresceína, sugere-se uma tendência de acúmulo no estrato córneo, com um perfil de permeação lento e de liberação baixa. Na permeação do EGF, os lipossomas mostraram-se melhores para entrega do ativo com ação local em relação ao EGF livre e lipossomas catiônicos apresentaram melhores perfis de permeação e interação com o estrato córneo, enquanto os aniônicos se difundiram para a epiderme.

PALAVRAS-CHAVES: Lipossomas. Revestimento polimérico. Permeação cutânea.

ABSTRACT

Liposomes are nanostructures used mainly as drug delivery systems and targeting agents in inflammatory process or associated to skin aging, because they can be absorbed through the skin and avoid the first-pass metabolism and reduce collateral effects. However, the stratum corneum, the external layer of the epidermis, operates as a barrier which limits the permeation of these compounds through the skin. Thus, there are several strategies to improve cutaneous permeation such as chemical composition, size and modification of the electrical potential of the interface. Among the polymers, the sodium alginate and chitosan are polysaccharides with anionic and cationic charge, respectively, both with potential application in sustained drug delivery systems, and as adjuvants in cutaneous permeation in liposomal compounds. Therefore, the objective of this work is characterizing cationic liposomes and liposomes coated with alginate and alginate-chitosan, to verify the role of electric charge surface potential in cutaneous permeation *in vitro*. For this purpose, the liposomes (Lip) were prepared from the cationic lipid dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) and 1,2 – dioleoyl-sn- glycerol- 3- phosphatidylethanolamine (DOPE) (LipD) by hydration of lipid film. The characterization of polymers was performed by nuclear magnetic resonance (NMR) and size exclusion chromatography (SEC). The presence of hydrophobic regions of liposomes was demonstrated by pyrene probe. The polymeric coating was made by Layer-by-Layer technique, with one layer of sodium alginate followed by one layer of chitosan, originating the structures Lip-A/LipD-A and Lip-C/LipD-C, respectively, which were characterized by infrared spectroscopy (FTIR) and determination of zeta potential (ζ), whose values obtained were $+79 \pm 0,4$ and $62 \pm 1,5$ to Lip/LipD, $-52 \pm 0,2$ and $-68 \pm 0,3$ to Lip-A/LipD-A and $39 \pm 0,3$ and $48 \pm 0,3$ mV to Lip-C/LipD-C, respectively. The determination of diameter of liposomes and coated liposomes was determined by dynamic light scattering, (DLS). Lip, LipA e LipC showed diameters of 66 ± 19 , 104 ± 13 and 204 ± 105 nm, respectively, while, in the presence of DOPE, the diameters were 34 ± 4 , 278 ± 36 and 216 ± 96 nm to LipD, LipD-A e LipD-C, respectively. The morphology and topography determined by atomic force microscopy, was 56 ± 8 , 125 ± 68 and 151 ± 24 nm to liposomes without DOPE and 63 ± 8 , 172 ± 30 and 165 ± 32 nm to liposomes with DOPE. The change of ζ potential, as well as the increase of size showed by liposome structures indicates that the polymeric coating was successful. After the encapsulation of epidermal growth factor (EGF), the incorporation efficiency was quantifying by the indirect method, where it presented an increase of 20 to 55% when coated. When the effect of coating over the cutaneous permeation was evaluated with fluorescence probe, it is suggested the tendency of accumulation in stratum corneum, with a profile of slow and low release. When EGF was tested, the liposomes were shown to be better for locally active delivery compared to free EGF solution and cationic liposomes show greater permeation and interaction with stratum corneum, while the anionics spread into epidermis.

KEYWORDS: Liposomes. Polymeric coating. Cutaneous permeation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO BROMETO DE DIMETIL-DIOCTADECIL AMÔNIO (DODAB) | 23 |
| FIGURA 2 – ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS LIPOSSOMAS, ONDE SUV: LIPOSSOMAS UNILAMELARES PEQUENOS, LUV: LIPOSSOMAS UNILAMELARES GRANDES, MLV: LIPOSSOMAS COM MULTILAMELARES..... | 23 |
| FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO ALGINATO, ONDE M: BLOCO DE SUBUNIDADES DE α -L-GULURONATO, N: BLOCO HETEROPOLIMÉRICO DAS SUBUNIDADES DE β -D-MANURONATO E α -L-GULURONATO E O: BLOCO DE SUBUNIDADES DE β -D-MANURONATO | 26 |
| FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA, ONDE X: SUBUNIDADE DE β -D-N-ACETILGLUCOSAMINA E Y: SUBUNIDADE DE β -D-GLUCOSAMINA | 28 |
| FIGURA 5 – ESQUEMA DE PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS POR REIDRATAÇÃO DE FILME LIPÍDICO | 32 |
| FIGURA 6 – ESQUEMA DO REVESTIMENTO POR TÉCNICA DE <i>LAYER-BY-LAYER</i> COM ALGINATO E QUITOSANA..... | 33 |
| FIGURA 7 – ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO CÉLULA DE DIFUSÃO DE FRANZ | 37 |
| FIGURA 8 – ESPECTRO DE RMN DE HIDROGÊNIO (^1H -RMN) RESOLVIDO PARA O ALGINATO EM D_2O , A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM (δ)..... | 41 |
| FIGURA 9 – ESPECTRO BIDIMENSIONAL HSQC (C–H) RESOLVIDO PARA A QUITOSANA EM D_2O E ÁCIDO ACÉTICO DEUTERADO, A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM PPM (δ). | 43 |
| FIGURA 10 – PRIMEIRA DERIVADA CALCULADA A PARTIR DA TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA QUITOSANA COM NaOH 0,1 mol L^{-1} | 44 |
| FIGURA 11 – ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO DIÂMETRO DO LIPOSSOMA DODAB 1 mmol L^{-1} POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO MEDIANTE SONICAÇÃO NOS TEMPOS 0 A 5 MINUTOS. | 46 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO DOPE | 47 |
| FIGURA 13 – ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM LIPOSSOMAS DE DODAB (LIP) E LIPOSSOMAS DODAB:DOPE (LIPD)..... | 48 |
| FIGURA 14 – RELAÇÃO ENTRE POTENCIAL ζ DOS LIPOSSOMAS E O VOLUME DE ALGINATO DE SÓDIO E QUITOSANA (AMBOS 1 MG ML ⁻¹ EM TAMPÃO ACETATO 0,01 MOL L ⁻¹ PH 4,72) ADICIONADOS PARA O REVESTIMENTO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE <i>LAYER-BY-LAYER</i> ... | 50 |
| FIGURA 15 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA OS POLÍMEROS QUITOSANA (QUI), ALGINATO (ALG) E UMA SOLUÇÃO DE ALGINATO E QUITOSANA (ALG-QUI) | 52 |
| FIGURA 16 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA OS LIPOSSOMAS SEM REVESTIMENTO (LIP), LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM ALGINATO (LIP-A), E LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM ALGINATO E QUITOSANA (LIP-C) | 54 |
| FIGURA 17 – MICROGRAFIAS DE AMPLITUDE DE LIPOSSOMAS (A), LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM ALGINATO (B), LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM ALGINATO E QUITOSANA (C) SENDO NA AUSÊNCIA (1) OU PRESENÇA (2) DE DOPE OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM) | 56 |
| FIGURA 18 – CURVA PADRÃO DE ALBUMINA PARA QUANTIFICAÇÃO DE EGF POR CLAE-UV (COLUNA SYMMETRY C-18 A 40 °C, FASE MÓVEL 60% H ₂ O, 40% ACETONITRILA 0,1% TFA, TEMPO DE ELUIÇÃO 7 MINUTOS) | 59 |
| FIGURA 19 – RAZÃO SINAL/CONCENTRAÇÃO VS CONCENTRAÇÃO EM ESCALA LOGARÍTMICA PARA DETERMINAÇÃO DA FAIXA LINEAR DINÂMICA DE TRABALHO | 60 |
| FIGURA 20 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA ALBUMINA (A), DO EGF PURIFICADO (B) E DO SOLVENTE CROMATOGRÁFICO (C) OBTIDO POR CLAE – UV (λ = 210 NM) (COLUNA SYMMETRY C-18 A 40 °C, FASE MÓVEL 60% H ₂ O, 40% ACETONITRILA 0,1% TFA, TEMPO DE ELUIÇÃO 7 MINUTOS) | 61 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 21 – DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DO EGF POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA | 62 |
| FIGURA 22 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DE EGF 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LIPOSSOMAS DODAB:DOPE E LIPOSSOMAS DODAB:DOPE REVESTIDOS CONTENDO EGF (LIPE, LIPE-A E LIPE-C) EM MEMBRANAS DE ÉSTER DE CELULOSE COM SOLUÇÃO RECEPTORA TAMPÃO PBS EM APARATO DE CÉLULA DE FRANZ AO LONGO DE 21H | 65 |
| FIGURA 23 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DE FLUORESCÉINA 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LIPOSSOMAS DODAB:DOPE E LIPOSSOMAS DODAB:DOPE REVESTIDOS CONTENDO FLUORESCÉINA (LIPD, LIPD-A E LIPD-C) EM MEMBRANAS DE PELES DE ORELHAS DE PORCO EM APARATO DE CÉLULA DE FRANZ AO LONGO DE 24H..... | 67 |
| FIGURA 24 – QUANTIDADE DE FLUORESCÉINA DETERMINADA POR FLUORIMETRIA NAS CAMADAS DA PELE DE PORCO | 68 |
| FIGURA 25 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DE EGF 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LIPOSSOMAS DODAB:DOPE E LIPOSSOMAS DODAB:DOPE REVESTIDOS CONTENDO EGF (LIPE, LIPE-A E LIPE-C) EM MEMBRANAS DE PELES DE ORELHAS DE PORCO EM APARATO DE CÉLULA DE FRANZ AO LONGO DE 24H..... | 70 |
| FIGURA 26 – QUANTIDADE DE EGF DETERMINADA POR CLAE NAS CAMADAS DA PELE DE PORCO | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 – ATRIBUIÇÕES DOS PICOS DAS ANÁLISES DE RMN DE HIDROGÊNIO (^1H -RMN) DO ALGINATO | 42 |
| TABELA 2 – ATRIBUIÇÕES DOS PICOS DAS ANÁLISES DE RMN DE CARBONO (^{13}C -RMN) E HIDROGÊNIO (^1H -RMN) DA QUITOSANA | 42 |
| TABELA 3 – VALORES DE MASSA MOLAR E RAIO DE GIRO PARA O ALGINATO (ALG) E QUITOSANA (QUI) OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO (SEC) | 45 |
| TABELA 4 – VALORES DE POTENCIAL ZETA (POTENCIAL ζ) DAS AMOSTRAS DE LIPOSSOMAS (LIP/LIPD) E LIPOSSOMAS REVESTIDOS (LIP-A/LIPD-A/LIP-C/LIPD-C) | 51 |
| TABELA 5 – BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR) OBSERVADAS NOS ESPECTROS DE ALGINATO (ALG), QUITOSANA (QUI) E UMA SOLUÇÃO DE ALGINATO E QUITOSANA (ALG-QUI) | 53 |
| TABELA 6 – BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR) OBSERVADAS NOS ESPECTROS DOS LIPOSSOMAS (LIP) E DOS LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM ALGINATO (LIP-A) E REVESTIDOS COM ALGINATO E QUITOSANA (LIP-C) | 54 |
| TABELA 7 – DIÂMETROS DOS LIPOSSOMAS E LIPOSSOMAS REVESTIDOS OBTIDOS POR DLS E AFM (N=20) | 57 |
| TABELA 8 – EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EGF EM LIPOSSOMAS DODAB 1 mmol L^{-1} DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO INDIRETO POR CLAE. | 62 |
| TABELA 9 – EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ DE EGF EM LIPOSSOMAS DODAB A $1, 5 \text{ E } 10 \text{ MMOL L}^{-1}$ DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO INDIRETO POR CLAE | 63 |
| TABELA 10 – EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ DE EGF EM LIPOSSOMAS DODAB:DOPE 5 mmol L^{-1} , DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO INDIRETO | 63 |

LISTA DE ABREVIÇÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS

| | |
|-----------------------------|--|
| α | - Coeficiente de Mark-Houwink |
| λ | - Comprimento de onda |
| D | - Dispersão |
| $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ | - Raio de giro |
| $^1\text{H-RMN}$ | - Ressonância magnética nuclear de próton |
| $[\eta]$ | - Viscosidade intrínseca |
| AFM | - <i>Atomic force microscopy</i> (microscopia de força atômica) |
| ALG | - Alginato de sódio |
| ATR | - Reflectância atenuada |
| BG | - Bloco homopolimérico de β -D-manuronato |
| BGM | - Bloco heteropolimérico de subunidade de α -L-guluronato e subunidade de β -D-manuronato |
| BM | - Bloco homopolimérico de α -L-guluronato |
| CMC | - Concentração micelar crítica |
| DODAB | - Brometo de dioctadecil-dimetil-amônio |
| DOPE | - 1,2 dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidiletanolamina |
| D_H | - Diâmetro hidrodinâmico |
| DLS | - <i>Dynamic light scattering</i> (espalhamento de luz dinâmico) |
| DNA | - <i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico) |
| EGF | - <i>Epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epidermal) |
| EGFR | - Receptor do fator de crescimento epidermal |
| FC | - Fatores de crescimento |
| FTIR/IV | - <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> (espectroscopia de infravermelho) |
| % GA | - Grau de acetilação |
| % GD | - Grau de desacetilação |
| HCl | - Ácido clorídrico |
| HPLC/CLAE | - <i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência) |
| HSQC | - <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> |
| IV | - Infravermelho |

| | |
|-------------------|---|
| Lip | - Lipossomas produzidos com DODAB |
| Lip-A | - Lipossomas produzidos com DODAB revestido com alginato |
| Lip-C | - Lipossomas produzidos com DODAB revestido com alginato e quitosana |
| LipD | - Lipossomas produzidos com DODAB:DOPE |
| LipD-A | - Lipossomas produzidos com DODAB:DOPE revestido com alginato |
| LipD-C | - Lipossomas produzidos com DODAB:DOPE revestido com alginato e quitosana |
| LipE | - Lipossomas produzidos com DODAB:DOPE com EGF encapsulado |
| LipE-A | - Lipossomas produzidos com DODAB:DOPE com EGF encapsulado revestido com alginato |
| LipE-C | - Lipossomas produzidos com DODAB:DOPE com EGF encapsulado revestido com alginato e quitosana |
| LBL | - <i>Layer-by-layer</i> |
| LUV | - <i>Large unilamellar vesicles</i> (vesículas unilamelares grandes) |
| MLV | - <i>Multi lamellar vesicles</i> (vesículas multilamelares) |
| Mn | - Massa molar média-numérica |
| Mw | - Massa molar média-ponderal |
| Potencial ζ | - Potencial Zeta |
| QUI | - Quitosana |
| RMN | - Ressonância magnética nuclear |
| R _H | - Raio hidrodinâmico |
| SEC | - <i>Size exclusion chromatography</i> (cromatografia de exclusão por tamanho) |
| SUV | - <i>Small unilamellar vesicles</i> (Vesículas unilamelares pequenas) |
| UV | - Ultravioleta |
| T _M | - Temperatura de transição de fase |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | OBJETIVOS | 17 |
| 1.1.1 | Objetivo Geral..... | 17 |
| 1.1.2 | Objetivos Específicos | 17 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 18 |
| 2.1 | PELE | 18 |
| 2.2 | FATORES DE CRESCIMENTO | 19 |
| 2.3 | LIPOSSOMAS REVESTIDOS | 20 |
| 2.3.1 | Alginato..... | 26 |
| 2.3.2 | Quitosana | 27 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 3.1 | MATERIAIS | 29 |
| 3.2 | MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICOS | 29 |
| 3.2.1 | Purificação da quitosana | 29 |
| 3.2.2 | Caracterização dos polímeros | 30 |
| 3.2.3 | Preparo dos lipossomas | 31 |
| 3.2.4 | Sonda de pireno | 33 |
| 3.2.5 | Revestimento dos lipossomas | 33 |
| 3.2.6 | Caracterização dos lipossomas..... | 34 |
| 3.3 | INCORPORAÇÃO DO EGF NOS LIPOSSOMAS | 35 |
| 3.3.1 | Purificação e quantificação do fator de crescimento epidermal | 35 |
| 3.3.2 | Preparo dos LipE | 36 |
| 3.3.3 | Eficiência de incorporação..... | 36 |
| 3.4 | ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO DO EGF | 37 |
| 3.4.1 | Estudo de permeação <i>in vitro</i> | 37 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 4.1 | MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICOS | 41 |
| 4.1.1 | Purificação e caracterização dos polímeros | 41 |
| 4.1.2 | Preparo dos lipossomas | 46 |
| 4.1.3 | Determinação da formação de ambientes hidrofóbicos nos lipossomas | 47 |
| 4.1.4 | Revestimento e caracterização dos lipossomas | 49 |
| 4.2 | INCORPORAÇÃO DO EGF NOS LIPOSSOMAS | 58 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2.1 | Purificação e quantificação do fator de crescimento epidermal | 58 |
| 4.2.2 | Preparo dos LipE e eficiência de incorporação | 62 |
| 4.3 | CINÉTICA DE LIBERAÇÃO E ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA | 64 |
| 4.3.1 | Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i> | 64 |
| 4.3.2 | Cinética de liberação | 65 |
| 4.3.3 | Permeação cutânea com peles suínas..... | 66 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 73 |
| | REFERÊNCIAS..... | 74 |
| | ANEXO I- CALIBRAÇÃO DAS CÉLULAS DE FRANZ..... | 85 |

1 INTRODUÇÃO

Fosfolipídeos são moléculas anfifílicas que possuem estrutura química caracterizada por um grupamento polar e caudas carbônicas apolares. Estas estruturas são capazes de interagir entre si formando bicamadas concêntricas, que, em solução aquosa, rearranjam-se em formas esféricas, chamadas de lipossomas (BANGHAM et al., 1965; EGBARIA; WEINER, 1990a; YAROSH, 2001). Os lipossomas apresentam dois compartimentos, um lipofílico formado entre as caudas hidrofóbicas da bicamada e um núcleo hidrofílico, sendo capazes de armazenar ativos como fármacos, proteínas, DNA e enzimas (EGBARIA; WEINER, 1990a).

Lipossomas administrados através da via cutânea tendem a ser mais seguros, uma vez que evitam efeitos colaterais que outras vias de absorção apresentam e aumentam a ação local de fármacos. Porém, a permeabilidade seletiva do estrato córneo confere à epiderme a função de barreira contra agentes externos, que pode ser um desafio a ser superado para melhorar o fluxo de ativos na administração tópica (BARRY, 2001; WILLIAMS; BARRY, 2012).

Uma alternativa para o aprimoramento do perfil cinético de liberação e penetração cutânea do lipossoma é o seu revestimento com polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicos (TORCHILIN, 2005), que pode controlar parâmetros cinéticos de liberação dos ativos, através de processos de difusão e relaxamento das cadeias poliméricas (KAMINSKI et al., 2016; PICHETH et al., 2016). Entre os polímeros que podem ser utilizados no controle da liberação de fármacos em lipossomas, tem-se o alginato, copolímero aniônico, e a quitosana, que é um polímero catiônico pseudonatural que pode ser utilizado tanto na forma polimérica quanto em partículas, vesículas, filmes e géis (AGNIHOTRI et al., 2004).

Já existem relatos na literatura do uso dos hidrogéis de quitosana como veículos utilizados para aumentar a permeação e absorção dos fármacos (ALEMDAROĞLU et al., 2006; ALSARRA, 2009; DEĞİM et al., 2011), o que a coloca como uma molécula de interesse para uso em sistemas de liberação de fármacos que envolvam cicatrização (DEĞİM et al., 2011). Além disso, revestimentos com alginato e quitosana são descritos para lipossomas e cápsulas para melhorar a liberação de ativos envolvidos na cicatrização, de forma menos invasiva e direta através da pele (VALENTA; AUNER, 2004; HAN et al., 2014).

Sabe-se que a taxa de penetração de fármacos através da pele é altamente dependente da composição lipídica dos lipossomas (KIRJAVAINEN et al., 1996) e o mecanismo de interação entre a estrutura do lipossoma e sua interação com a barreira formada pelo estrato córneo ainda não se encontra claramente definido. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da alteração do potencial elétrico de superfície de lipossomas, revestidos com biopolímeros, no aumento da permeação cutânea e na eficiência de encapsulamento do fator de crescimento epidermal (EGF) conforme o objetivo geral e específicos do presente projeto apresentados abaixo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar lipossomas catiônicos revestidos com alginato e quitosana quanto a liberação cutânea de fármacos.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Desenvolver lipossomas catiônicos;
- b) Realizar um nano-revestimento de lipossomas com alginato de sódio e quitosana;
- c) Caracterizar os lipossomas em termos de raio hidrodinâmico e a espessura do revestimento por espalhamento de luz dinâmico;
- d) Caracterizar o nano revestimento polimérico por infravermelho e potencial zeta.
- e) Encapsular o fator de crescimento (EGF) e quantificar a eficiência de encapsulamento;
- f) Analisar a cinética de permeação cutânea *in vitro* dos lipossomas e lipossomas revestidos em células de Franz;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PELE

A pele é constituída por três estruturas celulares independentes, a epiderme, mais externa, a derme, intermediária e o tecido subcutâneo, interna, intercaladas por apêndices e anexos cutâneos, como as glândulas sudoríparas, sebáceas e os folículos pilosos (WIECHERS, 1989; PROKSCH et al., 2008)

A epiderme é a principal responsável pela formação dos anexos cutâneos, produção de melanina e pela função protetora e imunológica devido a presença de células de Langerhans e células dendríticas. É dividida em 4 camadas celulares, sendo elas o estrato córneo, mais externa, a camada espinhosa, a camada granulosa e a camada basal, mais profunda. O estrato córneo é formado por queratinócitos anucleados, chamados de corneócitos, que compõe a principal barreira contra agentes externos e até mesmo a água. Já a camada basal se apresenta como um intermediário de ligação entre as camadas externas da epiderme com a derme (WIECHERS, 1989; PROKSCH et al., 2008).

A derme é uma camada de tecido conjuntivo integrado de fibras colágenas, elásticas e de reticulina, células filamentosas, dendríticas e mastócitos, mas sua célula principal é o fibroblasto capaz de sintetizar esses constituintes. O tecido subcutâneo, camada mais profunda ricamente vascularizada, é constituído principalmente por fibras e adipócitos e realiza a união entre a derme e os órgãos adjacentes (WIECHERS, 1989; PROKSCH et al., 2008).

A utilização da pele como via de absorção de fármacos evita dores, infecções devido a aplicações injetáveis, a perda de fármacos pelo metabolismo de primeira passagem quando absorvido via oral e ainda permite o controle de liberação transdérmico por períodos maiores (JEPPS et al., 2013). Entretanto, a variabilidade cutânea entre a população dificulta a penetração dos ativos, assim como a presença do estrato córneo limita a absorção de fármacos (WIECHERS, 1989). Para que ocorra a absorção na pele, o controle de tamanho das moléculas e sua solubilidade auxilia no desenvolvimento de sistemas de liberação que possam ser usados por essa via (JEPPS et al., 2013).

A absorção de ativos aplicados na superfície da pele ocorre através da penetração no estrato córneo ou nos apêndices, como os folículos pilosos. A

penetração através do estrato córneo leva o ativo para as outras camadas da epiderme e derme, que devido a sua vascularização, possibilita a absorção sistêmica (JEPPS et al., 2013). Superar a barreira do estrato córneo com estruturas que facilitem a difusão dos ativos altera o tipo de absorção e modular este transporte pode vetorizar os ativos para uma absorção local (acima ou entre a epiderme) ou sistêmica (abaixo da derme) (WIECHERS, 1989; JEPPS et al., 2013).

A difusão dos ativos para outras camadas posteriores ao estrato córneo pode ocorrer de forma intercelular, pelos espaços entre as células ou transcelular, pelo interior das células (WIECHERS, 1989). O caminho seguido pelo agente penetrante depende diretamente das suas características físico-químicas, onde moléculas pequenas com boa solubilidade tanto no óleo quanto na água penetram melhor que moléculas extremamente hidrofílicas ou hidrofóbicas (JEPPS et al., 2013).

A utilização da pele como via de absorção para fármacos mostra-se muito importante para tratamentos de doenças cutâneas e queimaduras. Os ativos utilizados podem ser fármacos, enzimas e proteínas, como os fatores de crescimento (PEARSON; WOLFORD, 2000).

2.2 FATORES DE CRESCIMENTO

A cicatrização é um processo complexo que inicia mediante a um dano tecidual de natureza química, física ou biológica e envolve a reestruturação física e fisiológica do tecido injuriado (PEARSON; WOLFORD, 2000; REINKE; SORG, 2012).

Durante todo o processo de cicatrização, várias etapas são realizadas, tais como coagulação, inflamação, síntese e deposição de uma nova matriz, angiogênese, epitelização e remodelação, onde cria-se um gradiente de células que, por retroalimentação positiva, produzem mediadores celulares e substâncias quimiotáticas, como os eicosanoides (leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas), citocinas (interleucinas, fator de necrose tumoral) e fatores de crescimento (fator de crescimento endotelial - EGF, fator de crescimento de fibroblasto - FGF, fator de crescimento plaqueta-derivado, PDGF, fator de crescimento transformador – TGF, fator de crescimento vascular endotelial – VEGF) (PEARSON; WOLFORD, 2000; REINKE; SORG, 2012).

Dentre todas as células envolvidas nesta recuperação, destacam-se os fatores de crescimento, polipeptídeos que controlam o crescimento e diferenciação de células para regulação e recuperação do tecido injuriado (SINGER; CLARK, 1999).

O fator de crescimento epidermal (EGF) é um polipeptídeo formado por 53 unidades de aminoácidos com peso molecular de 6 kDa. Ao ligar-se no seu receptor do tipo tirosina quinase (EGFR), inicia uma cascata de eventos e reações capazes de estimular respostas celulares, como alterar a migração, proliferação e diferenciação celulares, principalmente de queratinócitos e estimular a síntese de matriz extracelular (HARDWICKE et al., 2008).

Desta forma, o EGF é utilizado para aceleração do processo de epitelização e aceleração do processo regeneração de tecidos após danos causados por queimaduras, igualando-se a resultados obtidos com uso de pomadas comerciais já existentes (ALEMDAROĞLU et al., 2006; DEĞİM et al., 2011; MARQUEZ et al., 2013).

A absorção cutânea de EGF é estudada através de diferentes modelos de sistemas de liberação, como os hidrogéis, nanocápsulas e os lipossomas. Segundo a OECD, a absorção percutânea é uma terminologia geral para descrever a passagem de ativos através da pele, podendo ser especificados como penetração, quando há a entrada da substância em uma camada cutânea específica, permeação, quando ocorre a penetração de uma camada para outra estruturalmente diferente, e reabsorção, quando há a passagem para o sistema vascular (SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY, 2010).

2.3 LIPOSSOMAS REVESTIDOS

Surfactantes ou tensoativos são substâncias anfipáticas, moléculas compostas de uma extremidade hidrofóbica e a outra hidrofílica, que possuem propriedades de se adsorver em uma interface, alterando as propriedades físico-químicas destas interfaces, como reduzir a tensão superficial e interfacial de um líquido (COSGROVE, 2010). Os tensoativos podem apresentar diferentes propriedades que dependem principalmente da composição e proporção entre porções das cadeias hidrofílicas e hidrofóbicas. Sua classificação ocorre através da carga de sua porção hidrofílica - podendo ser catiônicos, aniônicos, não iônicos ou

anfóteros (possuem ambas as cargas) – ou de suas cadeias hidrofóbicas, podendo ser formadas por uma ou mais cadeias de hidrocarbonetos saturados ou insaturados (COSGROVE, 2010).

Quando colocados em solução, estas moléculas são capazes de se adsorver à interface líquido-ar e reduzir o trabalho necessário para minimizar a área de contato do líquido em relação ao ar, fazendo com que menos trabalho seja necessário para trazer uma molécula de surfactante para a interface quando comparado ao trabalho de trazer uma molécula de água a interface (MYERS, 1999; COSGROVE, 2010), em um processo espontâneo. Na interface, devido à tensão interfacial, as moléculas se agrupam, a fim de reduzir o contato das cadeias de hidrocarbonetos com a fase aquosa, que é estabilizada pela repulsão entre os grupos hidrofílicos e a repulsão entre as cadeias carbônicas das monocamadas (MYERS, 1999; COSGROVE, 2010).

Os lipídeos anfipáticos, quando em contato com água, primeiro difundem-se para interface, onde se adsorvem e adquirem a orientação correta. Ao se organizar, formam agregados lipídicos devido a interação das regiões hidrofílicas por ligações de hidrogênio e de suas porções hidrofóbicas por interações hidrofóbicas, como as forças de Van der Waals, num ordenamento que resulta numa maior estabilidade termodinâmica (BANGHAM et al., 1965; SZOKA; PAPAHAADJOPOULOS, 1980; LAOUINI et al., 2012; HUANG et al., 2014).

Neste processo, a geometria molecular é importante para definir a estrutura do agregado formado. Fatores como a área interfacial ocupada pela cabeça polar, volume e comprimento da cadeia hidrofóbica alteram a geometria e tamanho do agregado (COSGROVE, 2010).

Um exemplo de estrutura formada a partir destes agregados é a bicamada lipídica, onde duas monocamadas reorganizam-se devido a interações simultâneas entre a estrutura anfipática do lipídeo. Na tentativa de unir as cadeias de hidrocarbonetos ocorrem interações hidrofóbicas, que estabilizam as caudas apolares por forças de Van der Waals (LASIC, 1998; BITOUNIS et al., 2012; LAOUINI et al., 2012). As cabeças polares interagem entre si por ligações de hidrogênio buscando permanecer ligadas a solução aquosa (ISRAELACHVILI et al., 1977; LASIC, 1998; BITOUNIS et al., 2012; LAOUINI et al., 2012), resultando em uma conformação vesicular. As vesículas são formadas de tal forma que criam um

compartimento aquoso no interior das bicamadas separado do meio por uma barreira hidrofóbica, chamados de lipossomas.

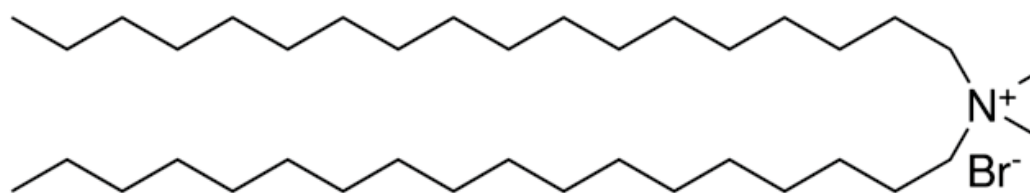
As interações hidrofóbicas são necessárias para a formação dos lipossomas, pois há o aumento da entropia (S) do sistema, devido à maior mobilidade das caudas hidrofóbicas protegidas dos ambientes aquosos e pelo aumento da entropia translacional do solvente, contribuindo termodinamicamente para o processo. A partir da equação de Gibbs (Equação 1), é possível observar que um aumento da entropia do sistema favorece a espontaneidade da formação da vesícula, levando a redução da energia livre (G) de Gibbs.

Concomitantemente à entropia, a temperatura tem um efeito semelhante sobre a energia livre, ou seja, temperaturas mais altas favorecem a espontaneidade do processo. Os fosfolipídeos sofrem uma transição gel-líquido-cristalino em determinadas temperaturas, eventos sempre endotérmicos, ou seja, valores entálpicos (ΔH) positivos, onde a membrana passa de um estado gelificado, cuja cadeia está completamente ordenada (gel), para um estado desordenado (líquido-cristalino). Vesículas que se encontram abaixo desta temperatura de transição de fase (T_m) apresentam uma bicamada organizada, com conformação estendida das cadeias alifáticas, área superficial mínima e espessura máxima da bicamada e acima são fluidos líquidos-cristalinos, com mobilidade das cadeias alifáticas, aumento da área superficial e menor espessura da bicamada lipídica (SZOKA JR; PAPAHAADJOPOULOS, 1980; SHARMA; SHARMA, 1997).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 1})$$

Para desenvolvimento do lipossoma neste trabalho, foi escolhido um lipídeo catiônico, o brometo de dimetil-dioctadecil amônio (DODAB), cuja cabeça polar é composta de um sal de amônio quaternário ligado à duas cadeias apolares de 18 carbonos saturados (FIGURA 1) (DOMENICI et al., 2012), que possui a T_m de aproximadamente 45°C (FEITOSA; BROWN, 1997). Acima desta temperatura, as moléculas de DODAB tendem a interagir entre si e formar bicamadas, sendo estáveis e mantendo-se organizadas mesmo a temperatura ambiente (FEITOSA; BROWN, 1997).

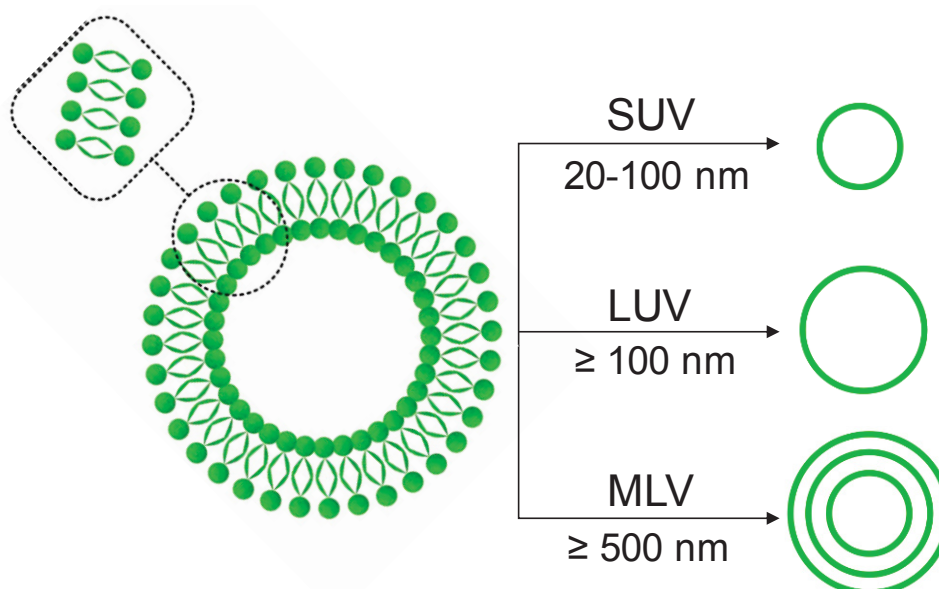
FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO BROMETO DE DIMETIL-DIOCTADECIL AMÔNIO (DODAB)



FONTE: O autor (2019).

Os lipossomas são classificados de acordo com o número de bicamadas, a carga e composição, todas características dependentes das espécies catiônicas, aniônicas ou lipídeos neutros empregados. Tipos específicos podem apresentar várias bicamadas de lipídeos (vesículas multilamelares, MLV) ou apenas uma, sendo diferenciada por seu tamanho, pequenas (do Inglês *Small Unilamellar Vesicles*, SUV), de 20 a 100 nm ou grandes (do Inglês *Large Unilamellar Vesicles*, LUV), acima de 100 nm (SHARMA; SHARMA, 1997; TORCHILIN, 2005; LAOUINI et al., 2012); como é possível visualizar na Figura 2.

FIGURA 2 – ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS LIPOSSOMAS, ONDE SUV: LIPOSSOMAS UNILAMELARES PEQUENOS, LUV: LIPOSSOMAS UNILAMELARES GRANDES, MLV: LIPOSSOMAS COM MULTILAMELARES.



FONTE: O autor (2019).

A composição dos lipossomas pode variar em relação a utilização de fosfolipídeos sintéticos ou naturais, colesterol e lipídeos modificados com polímeros (SHARMA; SHARMA, 1997). Tais materiais, por possuírem composição e

organização estrutural semelhante à membrana celular, são capazes de encapsular ativos hidrofílicos, que mantêm-se no interior aquoso do lipossoma, enquanto moléculas apolares encontram-se aderidas à região alquílica dos componentes estruturais (SZOKA; PAPAHAADJOPOULOS, 1980; YAROSH, 2001; TORCHILIN, 2005; LAOUINI et al., 2012). Lipossomas podem ser produzidos com vários tipos de lipídeos, que podem alterar suas propriedades de acordo com a composição e quantidade dos ácidos graxos de sua cadeia e grau de saturação (SMITH KORSHOLM et al., 2007).

Sistemas lipossômicos são utilizados no armazenamento e transporte de ativos, por serem capazes de preservar o fármaco, alterar a permeação e captação do ativo pelo seu sítio específico de ação e modular o tempo de circulação do mesmo no organismo, visando ampliar a captação pelas células (CHEN et al., 2000; BITOUNIS et al., 2012; LAOUINI et al., 2012). O uso dos lipossomas é amplo e difundido, uma vez que apresentam baixa toxicidade e imunogenicidade, alta biocompatibilidade e são biodegradáveis (SHARMA; SHARMA, 1997; LAOUINI et al., 2012). Seu uso como adjuvantes de vacinas (ALLISON; GREGORIADIS, 1974), sistemas de liberação de fármacos (EGBARIA; WEINER, 1990b; PARK et al., 2014), enzimas (BARROS, DE et al., 2016), fatores de crescimento (BOHL KULLBERG et al., 2002; DEĞİM et al., 2011) e material genético (INOH et al., 2017; RASOULIANBOROUJENI et al., 2017) é extensamente descrito na literatura.

Estes sistemas podem ser administrados por várias vias, como a via oral, ocular e dérmica (TORCHILIN, 2005). Considerando a absorção dos lipossomas pela via cutânea, a densidade da carga dos lipídeos no lipossoma é um fator que pode modificar a interação lipossoma-célula alvo, classificando-os como interativos ou não interativos com as células (BANGHAM et al., 1965; SHARMA; SHARMA, 1997). Lipídeos de carga neutra não apresentam interação com a membrana celular e o fármaco é liberado em meio extracelular para então atingir o interior da célula, atrasando o tratamento (SHARMA; SHARMA, 1997). Já para lipídios iônicos, como os lipídeos catiônicos, interagem com a membrana celular e com o estrato córneo, camada da pele que possui potencial elétrico superficial negativo (ROBERTS et al., 2017). Como exemplo, os lipossomas formados por DODAB apresentam capacidade de interagir com a superfície celular, através de interação eletrostática entre sua carga positiva com a carga negativa da membrana celular, induzindo a captação do ativo pela célula alvo (SMITH KORSHOLM et al., 2007), e formam estruturas rígidas

e impermeáveis, devido as suas cadeias longas alquílicas (AKBARZADEH et al., 2013).

Utilizar lipossomas como auxílio na absorção tópica de fármacos torna-se uma alternativa para reduzir possíveis efeitos colaterais e incompatibilidades quando administrados via sistêmica, bem como acumular este fármaco no local de ação sob a pele (EGBARIA; WEINER, 1990a), aumentando a ação local, tornando-os aptos para tratar injúrias, queimaduras e até mesmo doenças dérmicas, tornando a pele uma via importante de aplicação local ou sistêmica de fármacos.

A pele é uma barreira contra o ambiente externo, seletiva em relação a permeação. A camada mais externa da epiderme, o estrato córneo, é a camada principal em relação ao controle de absorção de moléculas e íons, dificultando ou atrasando a passagem dos mesmos para o interior da derme (BARRY, 2001; ROBERTS et al., 2017). Lipossomas, devido à sua carga, tamanho e composição, conseguem aumentar o fluxo de ativos por via cutânea, minimizando a função de barreira da epiderme (BARRY, 2001). Verma et al., (2003) demonstraram que lipossomas com diâmetros maiores penetravam pouco a epiderme, dificultando a absorção dos ativos, enquanto menores diâmetros permitiam a permeação para as camadas mais profundas da epiderme e derme, liberando mais ativos para o interior da pele.

A alteração da superfície do lipossoma pode modificar sua biodisponibilidade (LASIC, 1998), modulando a liberação dos ativos e vetorizando estes lipossomas para permeação em órgãos específicos (EGBARIA; WEINER, 1990a). Assim, tais lipossomas seriam otimizados quanto a administração cutânea de fármacos. Nanorevestimentos podem auxiliar nesta alteração de superfície com surfactantes como fosfatidilcolina (PC) e distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) (WOODLE et al., 1992) ou inserindo camadas de polímeros sintéticos como o polietilenoglicol (PEG) (ALLEN et al., 1989) ou com polímeros naturais, como o alginato e quitosana (TORCHILIN, 2005).

O revestimento realizado através da técnica de *Layer-by-Layer* ou camada a camada, aprimorada por Decher (1998), é um procedimento utilizado na produção de filmes que permite depositar camadas subsequentes de diferentes materiais, como polímeros, de maneira simples e com menor custo em relação a outras técnicas de produção de filmes para revestimentos. Neste procedimento, uma dispersão coloidal das partículas é colocada sobre uma dispersão com excesso do

material polimérico, para que ocorra a deposição do revestimento na superfície das partículas. Para a retirada do excesso dos polímeros não ligados, uma etapa de centrifugação é realizada e então é possível repetir o procedimento para deposição de mais camadas de revestimento (HONG et al., 1993; VILLIERS, DE et al., 2011).

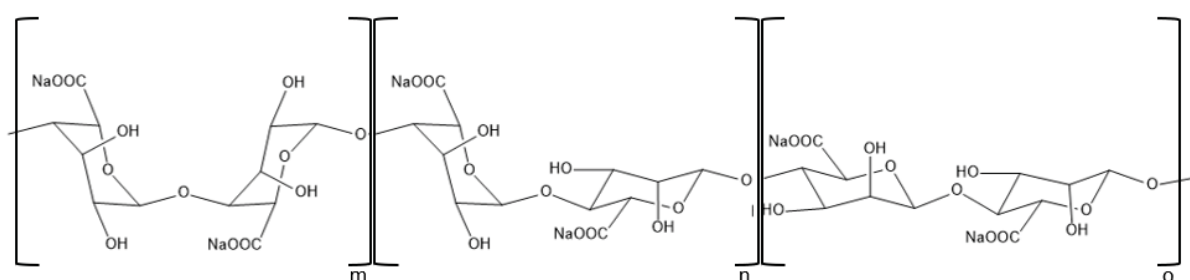
Para alterar o potencial elétrico de superfície dos lipossomas, cada deposição de camadas poliméricas realizados sobre o DODAB precisa inverter a carga de superfície, com um polímero aniônico (alginato de sódio), que se adsorve a superfície para compensar as cargas até que um potencial elétrico repulsivo seja estabelecido, favorecendo a adsorção seguinte de um polímero catiônico (quitosana) (HONG et al., 1993; DECHER et al., 1998; VILLIERS, DE et al., 2011), cujo grupamento amino interage com o grupamento carboxil do alginato de forma iônica (GAZORI et al., 2009).

2.3.1 Alginato

O alginato é um copolímero linear aniônico composto de blocos de unidades de β -D-manuronato (M) e α -L-guluronato (G) unidos por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 4), podendo ser arranjos consecutivos de cada um dos unidades ou serem alternados (FIGURA 3) (AARSTAD et al., 2012; LEE; MOONEY, 2012).

O alginato é extraído de algas e bactérias, e a fonte de extração altera a disposição e a proporção das unidades, gerando diferentes tipos de alginatos (GACESA, 1988; AARSTAD et al., 2012).

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO ALGINATO, ONDE M: BLOCO DE SUBUNIDADES DE α -L-GULURONATO, N: BLOCO HETEROPOLIMÉRICO DAS SUBUNIDADES DE β -D-MANURONATO E α -L-GULURONATO E O: BLOCO DE SUBUNIDADES DE β -D-MANURONATO



FONTE: O autor (2019).

O alginato de sódio é solúvel em água, sendo encontrado na sua forma polimérica, podendo ser utilizado na produção de microesferas, microcápsulas, fibras e hidrogéis, cuja formação depende diretamente da relação M/G em sua composição (LEE; MOONEY, 2012). Os blocos de resíduos G são capazes de reagir com cátions divalentes, como o cálcio (Ca^{2+}) e formar hidrogéis (AARSTAD et al., 2012; LEE; MOONEY, 2012). Soluções de alginato apresentam aumento em sua viscosidade em pH ácido, em torno de 3,5 vezes em relação ao pH neutro, devido a protonação dos grupos carboxilatos de sua estrutura, sendo capazes de realizar ligações de hidrogênio (DRAGET et al., 1994).

Por apresentar o aspecto gelatinoso, o alginato é utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica como agente de viscosidade e estabilizante (GACESA, 1988). Porém, em sua forma polimérica, também apresenta propriedades hemostáticas, tornando interessante seu uso em feridas (LEE; MOONEY, 2012).

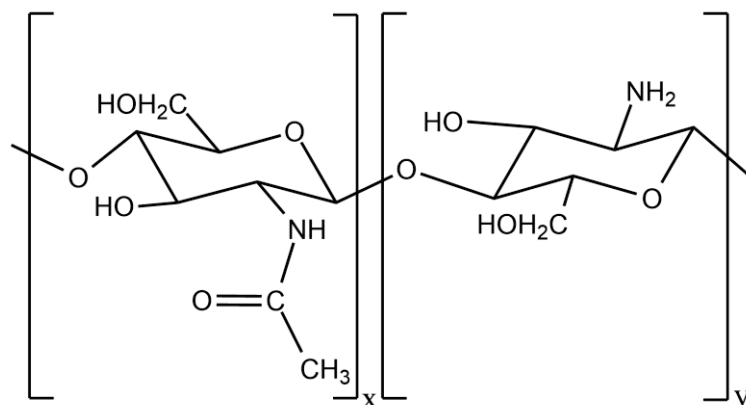
O revestimento polimérico com alginato em sistemas de liberação é amplamente utilizado, para liberação oral (BOWEY; NEUFELD, 2008), gástrica (ANAL; STEVENS, 2005), ocular (NAGARWAL et al., 2012) e tópica (MENG et al., 2010).

2.3.2 Quitosana

A quitosana é um polímero catiônico N-desacetilado derivado da quitina, composta de unidades monoméricas de β -D-glucosamina ligadas com β -D-N-acetilglucosamina por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 4) (FIGURA 4) (PATRULEA et al., 2015). É o único polímero pseudonatural catiônico (RINAUDO, 2006) e sua carga positiva em pH fisiológico torna-se eficaz para encapsular substâncias de carga negativa através de interações eletrostáticas (SINHA et al., 2004; RANGARI, 2015).

Devido a protonação dos grupamentos amino da glucosamina, a quitosana é insolúvel em soluções aquosas com pH acima de 7, podendo ser diluída em ácidos para melhorar sua solubilidade. Por ser um polímero gerado por reações de desacetilação, a massa molar e o grau de desacetilação afetam suas propriedades, fazendo com que apresente maior repulsão eletrostática intramolecular, desfavorecendo sua gelificação, que ocorre principalmente por ligações de hidrogênio (RINAUDO, 2006).

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA, ONDE X: SUBUNIDADE DE β -D-N-ACETILGLUCOSAMINA E Y: SUBUNIDADE DE β -D-GLUCOSAMINA



FONTE: O autor (2019).

A quitosana é utilizada como veículo de sistemas de liberação de fármacos, devido a sua natureza biocompatível, não-tóxica e por apresentar propriedades antimicrobianas, hemostáticas, mucoadesivas (PATRULEA et al., 2015), estimulante da diferenciação e proliferação de fibroblastos e queratinócitos (ALSARRA, 2009). Quando usada no revestimento de nanopartículas, a quitosana modula a interação com as células, aderindo-se à membranas e mucosas, melhorando o controle da liberação (MA et al., 2005).

Em aplicações tópicas, a quitosana apresenta potencial atividade hemostática, auxiliando na fase inflamatória da cicatrização, através da regulação da migração de neutrófilos e macrófagos para a reparação e reepitelização do tecido injuriado (ALEMDAROĞLU et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Para este trabalho, o lipídeo utilizado, DODAB foi obtido da Sigma Aldrich (LOTE: BCBR1922V), o DOPE da Avanti Polar Lipids (LOTE 5736PNA423), a quitosana utilizada foi obtida comercialmente da China e purificada como descrito em 3.2.1 (Shangyu Biotech Co, Ltda), o EGF da Pharmaspecial (LOTE: R17081402), fluoresceína isenta de ácido (> 90%) da Sigma Aldrich (LOTE: BCBL0038V), o pireno da Sigma. O hidróxido de sódio (97%) da Vetec, álcool etílico (99%) da Dibalcool, acetona (99%) da Reatec, ácido clorídrico (37%) da Vetec 0,1 mol L⁻¹, água deuterada (Sigma-Aldrich) e água deuterada com ácido acético deuterado (Cambridge Isotope Laboratories), clorofórmio (Êxodo Científica), acetonitrila grau HPLC e ácido trifluoroacético grau HPLC, álcool metílico (99%) Vetec. A água utilizada nos experimentos foi a ultrapura obtida de sistema MilliQ (Millipore). Todos os demais reagentes não citados foram de grau analítico.

3.2 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICOS

3.2.1 Purificação da quitosana

A quitosana foi purificada conforme descrito por Recillas et al. (2009) assim, 5g de uma quitosana bruta dispersos em 1L de solução de ácido acético 0,5 mol L⁻¹, seguido de agitação por 24 horas. A solução foi centrifugada a 10⁴ g a 25°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e neutralizado com hidróxido de sódio 10 mol L⁻¹. Uma nova etapa de centrifugação (10⁴ g, 5°C, 10 minutos) foi efetuada e o sobrenadante descartado. O precipitado foi sucessivamente lavado com álcool etílico e acetona sob intensa agitação e a solução foi novamente centrifugada (10⁴ g, 5°C, 10 minutos). O precipitado foi recolhido, triturado em gral e seco em estufa a vácuo 40°C. Este procedimento foi repetido por 3 vezes.

3.2.1.1 Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana

A determinação do grau de desacetilação da quitosana foi realizada através do teor de grupos amino (NH_2) presentes na molécula, utilizando-se o método de Broussignac (1968). Para tal, foram dispersas 250 mg de quitosana em 50 mL de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e deixada em agitação durante 24h. Posteriormente, a solução foi titulada com $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Com os resultados do volume gasto e do pH, foi plotado dois pontos de inflexão, dos quais foram calculadas a primeira derivada em relação ao pH, a fim de se determinar os dois picos (V_1 e V_2) em relação ao volume de ácido. O NaOH proporciona certeza na concentração da base. O grau de substituição foi determinado pela Equação 2:

$$\% \text{NH}_2 = [16,1 \times (V_2 - V_1) \times M] / m \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

$\% \text{NH}_2$ = grau de desacetilação da quitosana;

16,1 = relativo à massa molar do grupo amina;

V_1 = corresponde ao 1º pico do gráfico, referente ao volume (mL) de neutralização do ácido forte utilizado como solvente (HCl);

V_2 = corresponde ao 2º pico do gráfico, referente ao volume (mL) de neutralização do grupo NH_3^+ do polímero;

M = molaridade da base utilizada como titulante;

m = massa da amostra de polímero em solução (g).

3.2.2 Caracterização dos polímeros

A caracterização dos polímeros foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C em equipamento Avance DRX Bruker 400 MHz. Em eppendorf, foi pesado 15 mg de alginato e quitosana e adicionado água deuterada e água deuterada com ácido acético deuterado (100/2, v/v), respectivamente, mediante agitação até completa solubilização. As amostras foram posteriormente congeladas e liofilizadas. Este processo foi repetido duas vezes para então ser ressuspensionado com água deuterada e enviados para o RMN. As análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN) da UFPR.

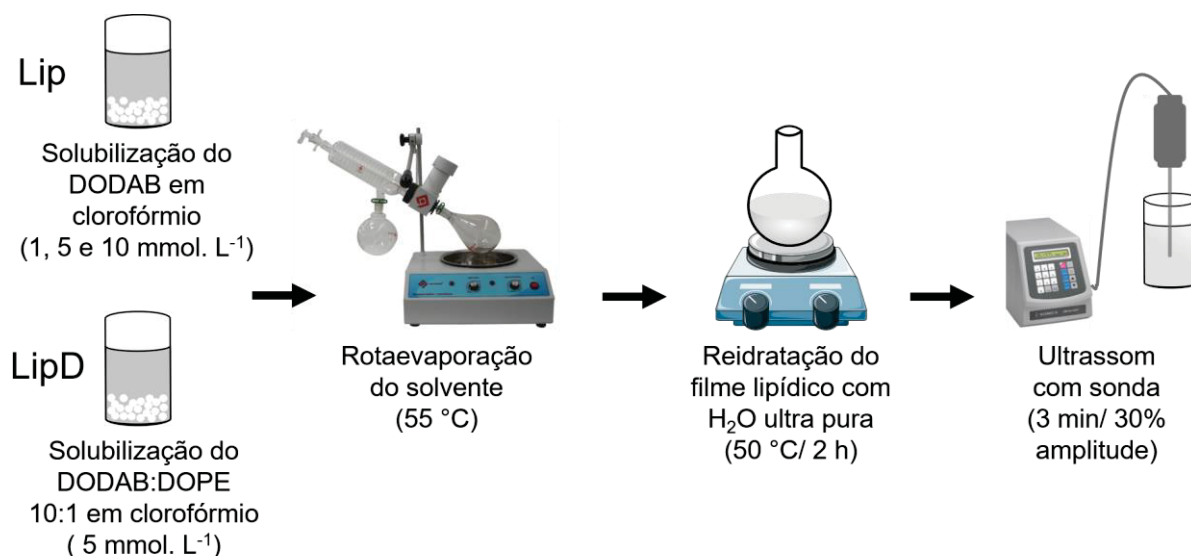
Para a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), a solução dos polímeros alginato 1 mg mL^{-1} e quitosana $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ($100 \text{ }\mu\text{L}$) foram injetados em cromatógrafo (Viscotek) composto por detectores de UV/Vis, índice de refração, espalhamento de luz laser, com coluna OHPak SB-806M HQ (Shodex) acopladas a um refratômetro diferencial, Viscotek (VE 3210 UV/VIS), detector de espalhamento de luz de 90° (RALS) e um detector de espalhamento de laser baixo ângulo (LALS), Viscotek 270, que promove uma leitura do espalhamento de luz, que é captada em diferentes intensidades. A fase móvel foi igual à da solubilização, nitrato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 200 ppm de azida sódica para o alginato e tampão acetato de sódio $0,1 \text{ M}$ com 200 ppm de azida sódica para a quitosana, ambos sob fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. Os experimentos de SEC foram realizados pela acadêmica de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química Joslaine Jacumazo e pela Dra. Mariana Mazetto de Carvalho do Biopol.

3.2.3 Preparo dos lipossomas

3.2.3.1 Lipossomas de DODAB

Os lipossomas foram preparados de acordo com Domenici et al. (2012), com modificações (FIGURA 5). O DODAB foi solubilizado em clorofórmio, em concentrações de 1 mmol L^{-1} e 5 mmol L^{-1} e o solvente foi rotaevaporado a 55°C formando um filme de lipídio na parede do balão, que foi ressuspenso em água ultrapura, sob agitação a 40°C por 2 horas, formando as amostras denominadas Lip.

FIGURA 5 – ESQUEMA DE PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS POR REIDRATAÇÃO DE FILME LIPÍDICO



FONTE: O autor (2019).

3.2.3.2 Teste de sonicação dos lipossomas de DODAB

Para verificar a influência da sonicação no tamanho dos lipossomas de DODAB, foram testados os tempos 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 e 5 minutos de sonicação com 30% de amplitude numa potência líquida na saída de 750 W com frequência de 20 kHz utilizando equipamento Sonics Vibracell VCX 750 com ponteira Tapered .

3.2.3.3 Lipossomas de DODAB:DOPE

Os lipossomas foram preparados de acordo com a metodologia anterior (3.2.3.1), onde o DODAB na concentração de 5 mmol L⁻¹ e o DOPE, na proporção molar de 10:1, foram solubilizados em clorofórmio e o solvente foi rotaevaporado a 55°C formando um filme de lipídio na parede do balão, que foi ressuspenso em água ultrapura, sob agitação a 40°C por 2 horas. Então, o material foi submetido a ultrassom (Sonics vibra cell) com sonda por 3 minutos, com 30% de amplitude, sem aquecimento e em banho de água a temperatura ambiente, obtendo as amostras denominadas LipD.

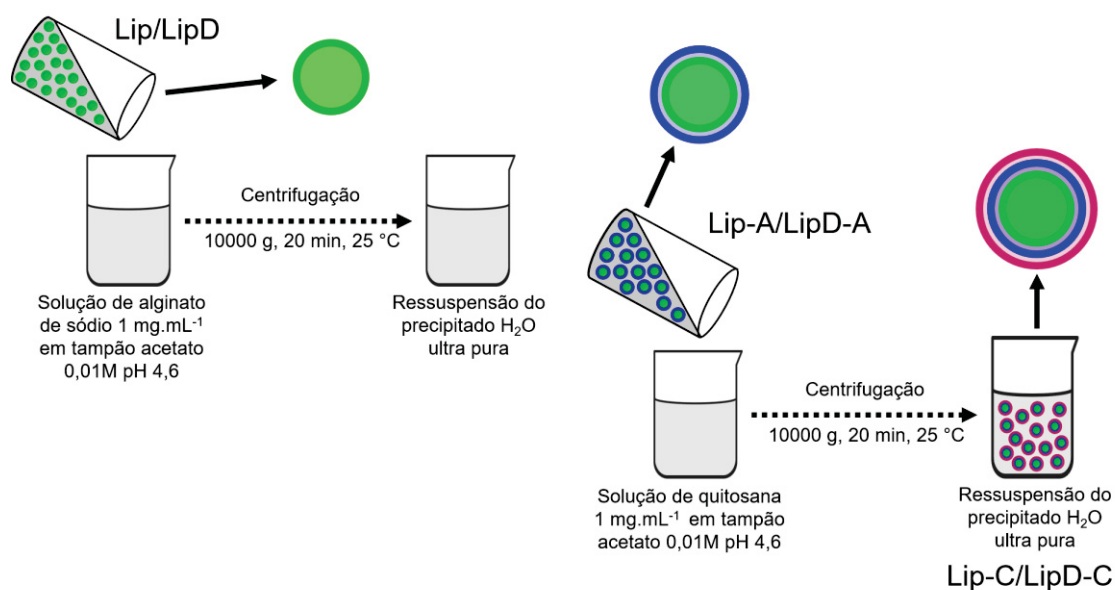
3.2.4 Sonda de pireno

Solução metanólica de pireno foi adicionado às amostras, com concentração final de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram analisadas em cubeta de quartzo para fluorescência, em espectrofotômetro de fluorescência Shimadzu RF – 5301PC, com excitação em 336 nm e varredura de 360 a 460 nm. Análises foram realizadas no Departamento de Bioquímica da UFPR.

3.2.5 Revestimento dos lipossomas

A suspensão de lipossomas foi colocada em solução de alginato de sódio 1 mg mL^{-1} em tampão acetato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,72, mediante agitação e foram centrifugados 10^4 g por 20 minutos, a 25°C . Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado com água ultrapura. Esta solução de lipossomas revestidos com uma camada de alginato (LipA) foi colocada sob solução de quitosana 1 mg mL^{-1} em tampão acetato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,72, novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensionado em água ultrapura, obtendo o lipossoma revestido com alginato e quitosana (LipC) (FIGURA 6).

FIGURA 6 – ESQUEMA DO REVESTIMENTO POR TÉCNICA DE *LAYER-BY-LAYER* COM ALGINATO E QUITOSANA



FONTE: O autor (2019).

3.2.6 Caracterização dos lipossomas

3.2.6.1 Espalhamento de luz dinâmico

Os lipossomas foram caracterizados por espalhamento de luz dinâmico (DLS), através da determinação do diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas e lipossomas revestidos com e sem DOPE (LipD, LipD-A e LipD-C/Lip, Lip-A e Lip-C), em equipamento NanoDLS (Brookhaven Instruments) a 90°, semelhante a Scarioti et al. (2011). Soluções diluídas 1:200 em água Milli-Q filtrada foram injetadas no equipamento por consecutivas análises de 10 minutos. Os diâmetros hidrodinâmicos (D_H) foram expressos pela média \pm desvio padrão.

3.2.6.2 Potencial zeta

O potencial zeta ($p\zeta$) dos lipossomas de DODAB e DODAB:DOPE foi determinado sem revestimento e com a camada de alginato e a de quitosana, a fim de relacionar a carga superficial das partículas, no seu plano de cisalhamento, com a carga superficial dos polímeros a cada camada de revestimento. No equipamento Stabino Particle Charge Mapping, foram colocados 10 mL da suspensão de lipossomas no copo para volumes de 10mL com pistão *gap* 400 μ m e foi adicionado alíquotas da solução de alginato até redução do $p\zeta$, para então ser adicionado a quitosana, até completa inversão e estabilização do potencial.

3.2.6.3 Espectroscopia de Infravermelho

As amostras de DODAB, DOPE, alginato, quitosana, lipossomas DODAB e DODAB:DOPE revestidos foram submetidas a análise de espectroscopia de infravermelho em espectrômetro Vertex 70 (Bruker, Alemanha) equipado com reflectância total atenuada (ATR). As análises foram realizadas pela acumulação de 16 scans com resolução de 4 cm^{-1} e comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} . As análises foram realizadas no departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

3.2.6.4 Microscopia de Força Atômica

A imagem topográfica dos lipossomas e lipossomas revestidos foi realizada através de microscopia de força atômica com aparelho Agilent 5500 Scanning Probe Microscope (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) e software de imagens Pico view (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). As imagens foram obtidas pelo modo contato intermitente com pontas de silício μ Masch® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) (constante de mola de 48 N/m e frequência de ressonância de ~190 KHz) e resolução de $4,0\ \mu\text{m} \times 4,0\ \mu\text{m}$. O tratamento de dados foi conduzido com o software Gwyddion (Czech Metrology Institute).

3.3 INCORPORAÇÃO DO EGF NOS LIPOSSOMAS

3.3.1 Purificação e quantificação do fator de crescimento epidermal

O EGF adquirido para ser utilizado neste trabalho trata-se de um peptídeo *like*, um peptídeo com a atividade do fator de crescimento epidermal que compreende uma parte da cadeia polipeptídica lipossomado. Para a quantificação do EGF foi necessário retirá-lo do lipossoma por uma etapa de centrifugação com Triton X-100 6% na proporção 1:1, a 4 000 g por 30 minutos, a 25°C, seguida de 4 etapas de lavagem por tampão fosfato, pH 7,2, em tubo Amicon com *cutoff* de 3 kDa (Millipore), inferior ao tamanho do EGF descrito em literatura de 6 kDa (HARDWICKE et al., 2008)

A quantificação de EGF foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de ultravioleta (UV) seguindo uma curva padrão de albumina, utilizando cromatógrafo Prominence (Shimadzu) com coluna Symmetry C18 (4,6 x 250 mm, partículas de 5 μm). As condições cromatográficas aplicadas seguiram o trabalho de Kaminski et al., (2016) com eluição em modo isocrático utilizando fase móvel constituída de 60% água ultrapura, 40% acetonitrila e 0,1% ácido trifluoroacético sob fluxo de $1\ \text{mL min}^{-1}$ a 40°C. O tempo de corrida foi de 7 minutos e comprimento de onda utilizado para detecção do peptídeo foi de 210 nm e de 280 nm para a detecção de possíveis resíduos de Triton X-100.

A curva padrão foi construída a partir de diluições de uma solução-mãe (1 mg mL⁻¹) de albumina em água ultrapura, sonicada durante 3 minutos. As diluições utilizadas foram de 10 a 100 µg mL⁻¹ com a fase móvel como solvente.

Previamente a injeção no sistema cromatográfico, as diluições foram filtradas em membrana de PTFE 0,22 µm. Foram injetadas 100 µL de cada diluição, em triplicata, nas mesmas condições cromatográficas citadas acima. Através da curva obtida, foram calculados a de faixa de trabalho, limite de quantificação, limite de detecção, precisão intermediária.

A determinação do ponto isoeletrico do EGF foi realizada no equipamento Stabino Particle Charge Mapping, onde foram colocados 10 ml do peptídeo purificado, diluído 1:500, no copo para volumes de 10mL com pistão gap 400 µm. A amostra então foi titulada com HCl 0,01 mol L⁻¹ até pH 2 e posteriormente até pH 9 com NaOH 0,01 mol L⁻¹.

3.3.2 Preparo dos LipE

Os lipossomas contendo EGF foram produzidos de forma já descrita no item 3.2.3.3, onde o filme lipídico foi ressuspenso em uma solução de 50 µg mL⁻¹ de EGF purificado. Os lipossomas foram revestidos da mesma forma com alginato e quitosana (LipE, LipE-A, LipE-C), tendo seu diâmetro determinado por espalhamento de luz dinâmico a cada etapa de revestimento.

3.3.3 Eficiência de incorporação

A eficiência de incorporação do EGF nos lipossomas foi quantificada de maneira indireta. Os lipossomas foram centrifugados (10⁴ g/ 20 min/ 25 °C) e o sobrenadante foi analisado por CLAE para determinar a quantidade não incorporada, e indiretamente o quanto foi incorporado, calculado a partir da Equação 3.

$$\text{Eficiência de incorporação} = \left\{ \left(\frac{\text{EGF no sobrenadante}}{\text{EGF total}} \right)^{-1} \right\} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

3.4 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO DO EGF

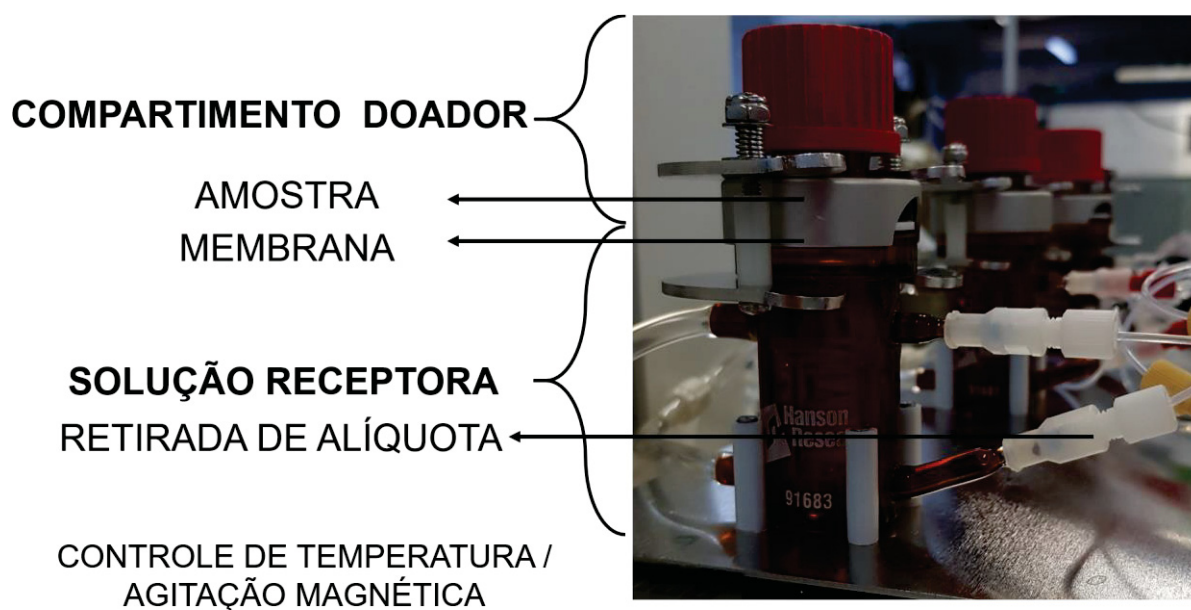
3.4.1 Estudo de permeação *in vitro*

O estudo de permeação cutânea foi realizado no aparato de Célula de Difusão de Franz que consiste em um equipamento onde 12 células termoaquecidas mimetizam a difusão de ativos através da pele.

O equipamento consiste em uma célula de difusão, uma cuba com meio receptor e um coletor automático de alíquotas (MicroettePlus Q-Pak – Sistema Automático, HANSON RESEARCH Co., Chatsworth, USA). O aparato da célula é preenchido por um líquido receptor coberto por uma membrana sintética ou pele onde é inserida a fase doadora (amostra líquida). A temperatura do líquido receptor é controlada através de um banho termostatzado (Termocirculador de Água DC5) e a temperatura utilizada foi de 36 °C, temperatura corporal (FRANZ, 1975) (FIGURA 7).

As células utilizadas eram do tipo âmbar, cujos volumes foram determinados através de calibração realizada previamente. As análises foram realizadas no departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

FIGURA 7 – ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO CÉLULA DE DIFUSÃO DE FRANZ



FONTE: O autor (2019).

3.4.1.1 Cinética de liberação do EGF

No aparato de célula de Franz, a solução doadora de 2,5 mL da solução de lipossomas contendo EGF (LipE, LipE-A, LipE-C) foram colocadas sob uma membrana de diálise de éster de celulose de diâmetro de poro de 3kDa cortadas em forma circular e o meio receptor escolhido foi o tampão salino fosfato (PBS) 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4.. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em intervalos de tempos de 0, 1, 3, 5, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 21h, com reabastecimento da solução receptora e quantificados por CLAE. As alíquotas retiradas foram filtradas em membranas de éster de celulose 0,22 µm, e analisadas por CLAE.

3.4.1.2 Preparação dos lipossomas com fluoresceína

Para a permeação dos lipossomas em membranas animais, uma sonda de fluorescência foi realizada. A fim de verificar a permeação cutânea do sistema lipossomal e seu revestimento, lipossomas contendo DOPE, LipD, foram selecionados para realizar a permeação cutânea. Os LipD foram preparados da forma descrita anteriormente (item 3.2.3.3), ressuspensos em uma solução de fluoresceína de 0,5 µg mL⁻¹ e revestidos de maneira já descrita (item 3.2.5).

A quantificação da fluoresceína foi realizada por espectrofluorimetria seguindo uma curva padrão utilizando leitor de microplacas Tescan Infinite M200, em placas de 96 poços (Greiner 96 U Bottom Black Polystyrol), com excitação em λ = 488 nm e emissão em λ =518 nm, ganho de 60%, 25 flashes e tempo de integração de 20 s. A curva padrão foi construída a partir de diluições de uma solução-mãe (1 mg mL⁻¹) de fluoresceína em etanol, com as diluições de 1 a 0,1 µg mL⁻¹ e 100 a 10 ng mL⁻¹ em tampão PBS pH 7,4.

3.4.1.3 Permeação dos LipD contendo fluoresceína em membranas animais

A membrana animal, pele da orelha de porco (*Sus domesticus*), utilizada para os estudos de permeação, foi doada pelo frigorífico comercial (Thoms), onde foi retirada antes do escaldamento do animal, processo de limpeza com aquecimento, para que a integridade da pele se mantenha. A cartilagem da parte externa das orelhas foi cuidadosamente retirada com bisturi e armazenadas em refrigeração.

Foram então recortados discos de área de absorção de $2,01 \text{ cm}^2$ para a utilização durante os experimentos e a integridade das peles foi determinada por quantificação da perda de água transepidérmica utilizando equipamento VapoMeter (Delfin) (JAKASA; KEZIC, 2008), obtendo valores médios de $8,67 \pm 0,2 \text{ g m}^{-2}\text{h}^{-1}$.

A permeação dos lipossomas contendo fluoresceína foi realizada utilizando o sistema de células de difusão de Franz, onde as peles de orelha foram cortadas circularmente e colocadas sobre as células, com a derme em contato com a solução receptora (Tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) e o volume do compartimento receptor correspondeu em média a 6 mL, sendo padronizados para obter o volume de cada célula individualmente. Os lipossomas e lipossomas revestidos foram colocadas no compartimento doador num volume de 1 mL, proporcionando um regime dose infinita ao experimento. A quantidade permeada foi analisada em alíquotas de 400 μL da solução receptora retirada em tempos determinados (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 e 24 h) e reabastecidas com a solução receptora, imediatamente.

Após a finalização das 24 h, o material não permeado sob a membrana foi alíquotado, a membrana foi lavada com cotonete, e posteriormente retiradas das células. Ambas as amostras foram extraídas com álcool metílico (4 mL) que foi totalmente evaporado à temperatura ambiente, em seguida, 400 μL de água foi vertido sobre o material, após agitação e sonicação do conteúdo, o volume total foi analisado por espectrofluorímetro.

3.4.1.4 Permeação dos LipD contendo EGF em membranas animais

Para testar a permeação dos lipossomas e lipossomas revestidos contendo EGF, a solução dos lipossomas foi colocada na solução doadora, numa condição preconizada para $10 \mu\text{L cm}^{-2}$ (OECD, 2004), sob as membranas de animal, com o mesmo sistema descrito no procedimento 3.4.1. Os LipE, LipE-A e LipE-C foram colocadas no compartimento doador num volume de 2,5 mL, com regime dose infinita, onde a taxa de fluxo não impede a difusão da substância de teste no fluido receptor (OECD, 2004). A quantidade permeada foi analisada em alíquotas de 1,5 mL da solução receptora retirada em tempos determinados (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 e 24 h) e reabastecidas com a solução receptora, imediatamente.

Após a finalização das 24 h, o material não permeado sob a membrana foi aliqotado, tratado da mesma forma que no procedimento 3.4.1.3 e o volume total foi analisado por CLAE.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

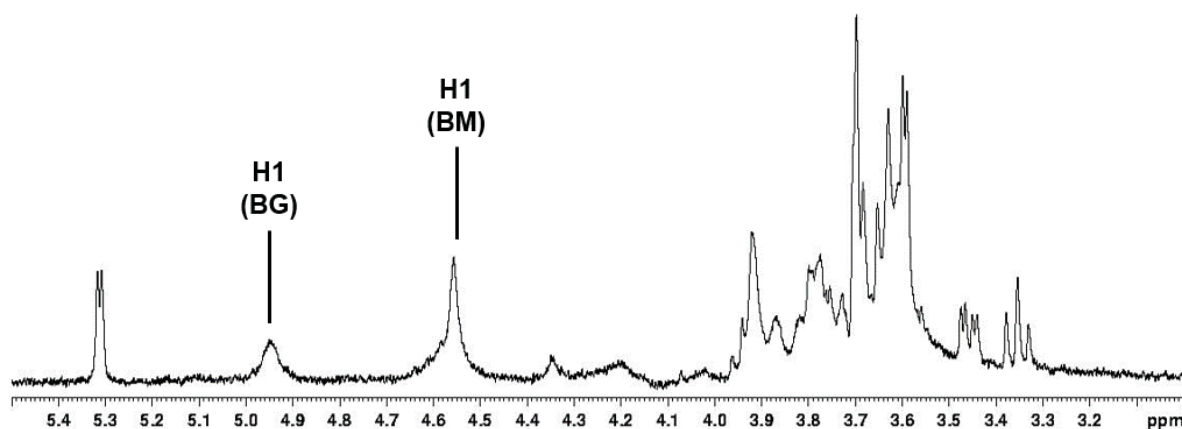
4.1 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICOS

4.1.1 Purificação e caracterização dos polímeros

O alginato de sódio (ALG) utilizado no presente trabalho possui aspecto granulado de coloração bege, enquanto a quitosana (QUI) apresentou-se como um pó de coloração levemente amarelada. Ambos os polímeros foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia de exclusão de tamanho (SEC).

O espectro de RMN de hidrogênio (^1H -RMN) do alginato (FIGURA 8) foi assinalado de acordo com a literatura (GRASDALEN, 1983). Esse espectro apresentou na região anomérica os sinais em 4,95 e 4,55 ppm, correspondentes ao H-1 das unidades 4-ligadas de ácido α -L-gulurônico (G) e β -D-manurônico (M), constituintes dos blocos BG e BM, respectivamente. A integração dos sinais em 4,95:4,55 foi 1:2,8, indicando, portanto, a presença de 2,8 vezes mais blocos BM em relação aos blocos BG.

FIGURA 8 – ESPECTRO DE RMN DE HIDROGÊNIO (^1H -RMN) RESOLVIDO PARA O ALGINATO EM D_2O , A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ).



FONTE: O autor (2019).

As correlações referentes aos hidrogênios de H-2-H-5 destas unidades encontram-se na Tabela 1. Não foram observados no espectro os sinais dos hidrogênios das unidades constituintes do bloco BGM, sugerindo que este alginato é formado majoritariamente por blocos homopoliméricos. Adicionalmente, o espectro

do alginato apresentou um deslocamento químico em 5,3 ppm, o qual foi atribuído ao H-1 da extremidade redutora, que é apresentado em valores de ppm mais altos quanto comparado ao H-1 das unidades internas do polímero. Desta maneira, esse sinal sugere a presença de alginatos de menor massa molar (oligossacarídeos) (GRASDALEN, 1983).

TABELA 1 – ATRIBUIÇÕES DOS PICOS DAS ANÁLISES DE RMN DE HIDROGÊNIO (^1H -RMN) DO ALGINATO

| Unidade | Blocos | Hidrogênios ligados aos Carbonos | ^1H (δ) |
|---|--------|----------------------------------|---------------------------|
| [\rightarrow 4) α -L-Gul-(1 \rightarrow] | BG | 1 | 4,95 |
| | | 2 | 3,79 |
| | | 3 | 3,92 |
| | | 4 | 4,07 |
| | | 5 | 4,34 |
| | | 6 | - |
| [\rightarrow 4) β -D-Man-(1 \rightarrow] | BM | 1 | 4,55 |
| | | 2 | 3,59-3,60 |
| | | 3 | 3,92 |
| | | 4 | 3,79 |
| | | 5 | 3,59/3,60 |
| | | 6 | - |

FONTE: O autor (2019).

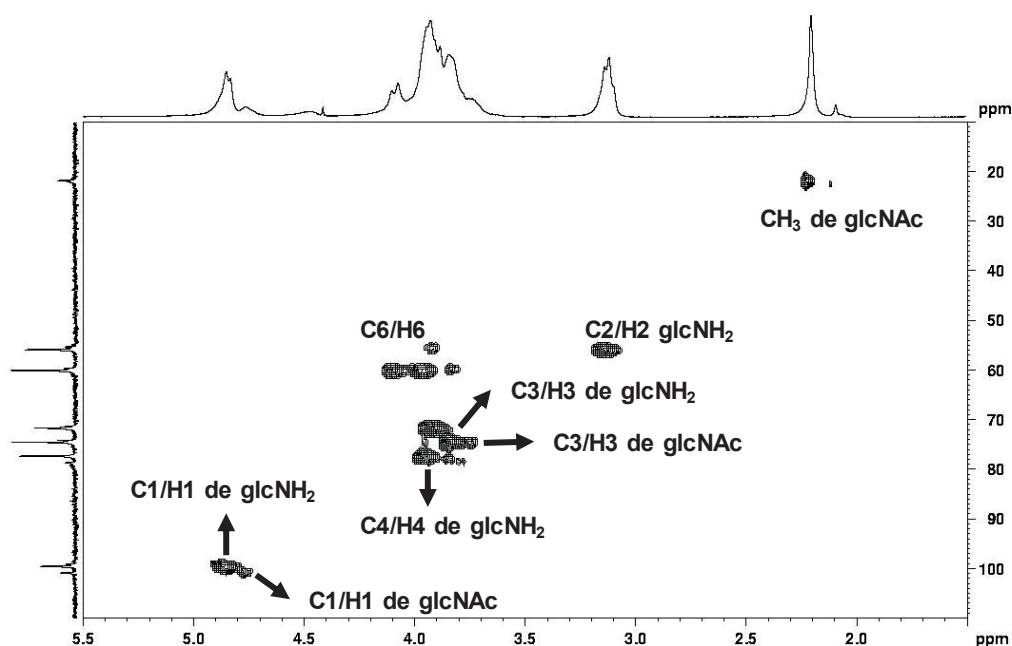
A caracterização da quitosana ocorreu após sua purificação, que apresentou rendimento de 39,5%. A quitosana purificada foi analisada por RMN de ^{13}C , ^1H e HSQC (FIGURA 9). Os deslocamentos químicos foram assinalados de acordo com a literatura (KASAAI, 2010) e estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – ATRIBUIÇÕES DOS PICOS DAS ANÁLISES DE RMN DE CARBONO (^{13}C -RMN) E HIDROGÊNIO (^1H -RMN) DA QUITOSANA

| Posição | | |
|--------------------|---------------------------|------------------------------|
| glcNH ₂ | ^1H (δ) | ^{13}C (δ) |
| 1 | 4,85 | 100 |
| 2 | 3,12 | 55,9 |
| 3 | 3,37 | 74,3 |
| 4 | 3,85 | 77,1 |
| 5 | 3,85-3,94 | 71,9 |
| 6 | - | 60,0 |
| glcNAC | ^1H (δ) | ^{13}C (δ) |
| CH ₃ | 2,23 | 21,8 |

FONTE: O autor (2019).

FIGURA 9 – ESPECTRO BIDIMENSIONAL HSQC (C–H) RESOLVIDO PARA A QUITOSANA EM D₂O E ÁCIDO ACÉTICO DEUTERADO, A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ).



FONTE: O autor (2019).

O espectro de HSQC da quitosana apresentou as correlações anoméricas em 100,0/4,85 e 100,4/4,76 ppm, correspondentes ao C-1/H-1 das unidades de glucosamina e acetil-glucosamina, respectivamente.

Adicionalmente foi calculado o grau de desacetilação, um importante parâmetro de caracterização, definido como a relação entre os grupamentos amino e os grupamentos amida da estrutura da quitosana, que pode ser determinado tanto por RMN quanto por titulação potenciométrica (SANTOS et al., 2003).

$$GD[\%] = \left[1 - \left(\frac{I_{CH3-D}}{3 \times I_{H1-A}} \right) \right] \cdot 100$$

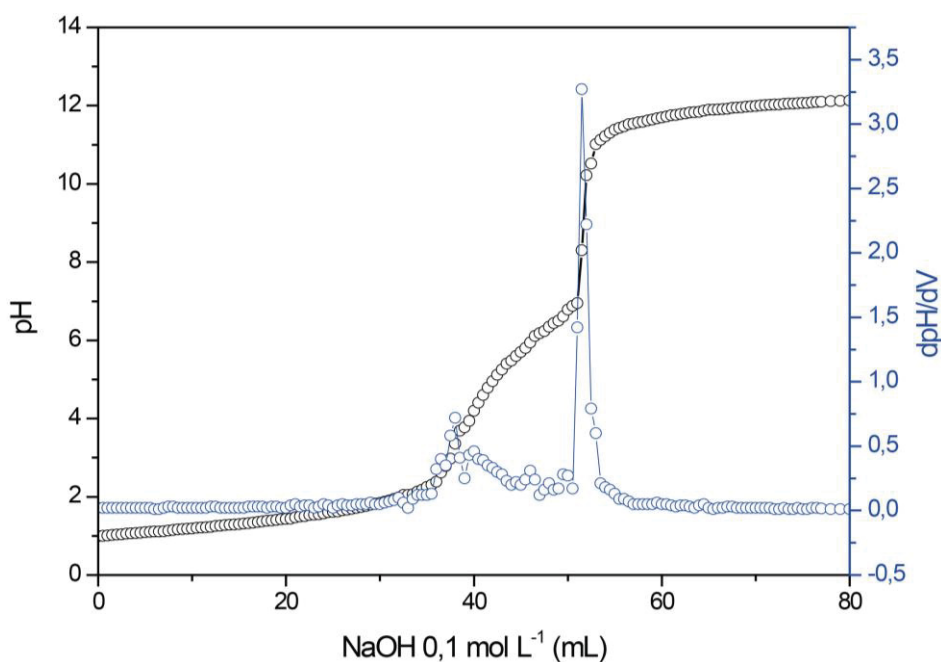
(Equação 4)

FONTE: KASAI, 2010

A determinação do GD (grau de desacetilação) por ¹H-RMN (TABELA 2) foi obtida utilizando a razão entre a área na região de 2 ppm referentes aos hidrogênios do grupamento metila do grupo acetamido (glc-NAc) (2,23 ppm) e a área do deslocamento químico em 3 ppm referente ao H-1 do anel de glucosamino (glc-NH₂) (4,85 ppm), seguindo a Equação 4. O valor de porcentagem de GD da quitosana obtido por RMN foi de 84,7%.

Para a comparação, o GD também foi calculado por titulação potenciométrica. Com base na Equação 2, foi calculado a porcentagem de grau de desacetilação (GD) obtido por titulação após três purificações sequenciais de quitosana, sendo que os volumes de neutralizações podem ser observados na Figura 10. O primeiro ponto de inflexão obtido representa a neutralização do ácido usado como solvente, seguido de um segundo ponto de inflexão, correspondente à neutralização do grupamento amino NH_3^+ da quitosana. Quando foram plotados a sua derivada do pH em função do volume em função do volume titulado de NaOH, foi quantificada a porcentagem de GD em 72,6 %, valor próximo ao obtido por RMN.

FIGURA 10 – PRIMEIRA DERIVADA CALCULADA A PARTIR DA TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA QUITOSANA COM NaOH 0,1 mol L⁻¹



FONTE: O autor (2019).

A quitina, polissacarídeo precursor da quitosana, apresenta grau de acetilação de 100%, ou seja, quando o polissacarídeo obtém valores de acetilação menores que 50%, é possível classificá-lo como quitosana (RINAUDO et al., 1993). Quanto maior o grau de desacetilação, a quitosana aumenta sua solubilidade em soluções aquosas contendo ácidos (RINAUDO et al., 1993). Desta forma, a quantificação dos 72,6% de desacetilação da quitosana utilizada neste trabalho condiz com a natureza do polissacarídeo, permitindo o seu uso para os experimentos, apresentados na sequência do texto, de revestimento do lipossoma.

Os polímeros foram também caracterizados por cromatografia de exclusão de tamanho onde os valores de massa molar, viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e raio de giro ($\langle S^2 \rangle^{1/2}$) obtidos podem ser observados na Tabela 3.

TABELA 3 – VALORES DE MASSA MOLAR E RAIOS DE GIRO PARA O ALGINATO (ALG) E QUITOSANA (QUI) OBTIDOS POR CROMATOGRAPHIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO (SEC)

| Parâmetro | ALG | QUI |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| M_w (g mol ⁻¹) | $2,8 \times 10^5$ | $1,9 \times 10^5$ |
| M_n (g mol ⁻¹) | $1,9 \times 10^5$ | $1,3 \times 10^5$ |
| $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ (nm) | 16,9 | 23 |
| $\bar{D} = M_w/M_n$ | 1,47 | 1,46 |
| $[\eta]$ (dL g ⁻¹) | 1,2 | 2,1 |
| Coefficiente "α" Mark-Houwink | 1,0 | 0,7 |
| Recuperação (%) | 60,6 | 57,8 |

FONTE: O autor (2019).

* M_w : massa molar ponderal média. M_n : massa molar numérica média. $\langle S^2 \rangle^{1/2}$: raio de giro. \bar{D} : dispersão. $[\eta]$: viscosidade intrínseca.

Para os dois polímeros foi obtida baixa polidispersão, de 1,47 e 1,46 demonstrando um perfil homogêneo. Já considerando o valor de α de Mark-Houwink que define a configuração tridimensional da cadeia polimérica, valores de 0,0 – 0,5 são atribuídos às esferas rígidas, 0,5 – 0,8 em *random coils* e de 0,8 – 2,0, para polímeros menos flexíveis, formando uma formação de cadeia rígida, *stiff chain* (MASUELLI, 2014). Nos polímeros analisados, as conformações obtidas a partir do α foram de cadeia rígida e *random coil* para o alginato e quitosana, respectivamente.

A baixa recuperação do alginato obtida corrobora com os dados obtidos no ¹H-RMN demonstrando a presença de oligossacarídeos. Os alginatos podem apresentar uma faixa de massas molares de 50-100 kg mol⁻¹, de modo que o valor obtido para este alginato ($2,8 \times 10^5$ g mol⁻¹) encontra-se dentro nesta faixa. A viscosidade do alginato também é reduzida, uma vez que sua viscosidade reduz com o aumento da taxa de cisalhamento e é dependente da concentração (AUGST et al., 2006).

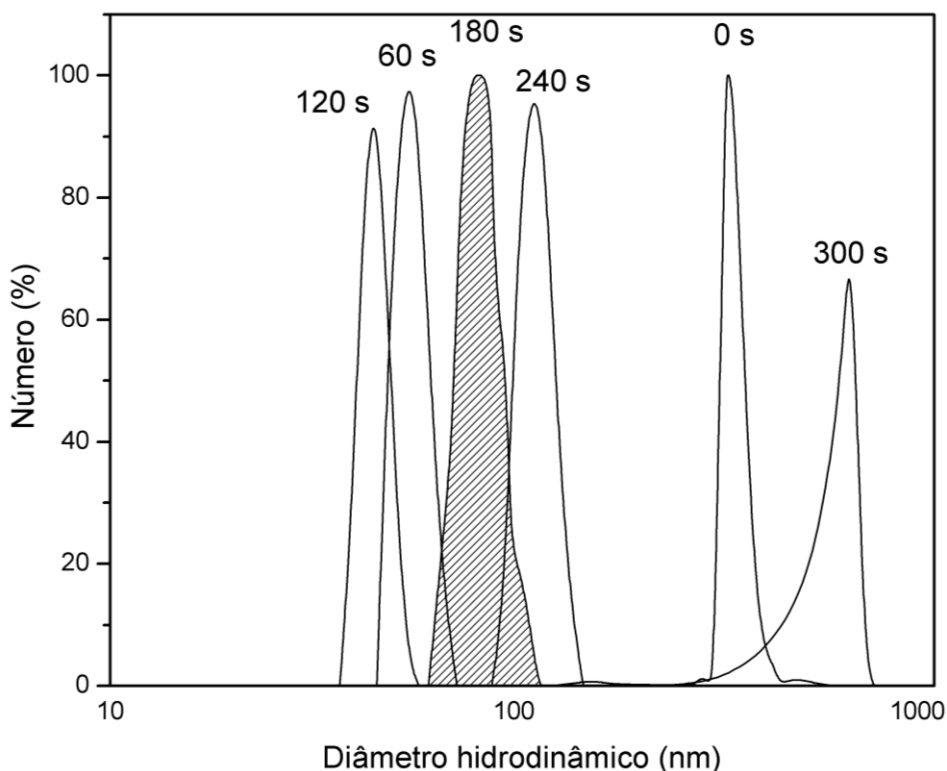
Para a quitosana, massas molares menores que $2,2 \times 10^5$ g mol⁻¹ já foram quantificadas (ZHENG; ZHU, 2003), podendo ser comparada com o M_w de $1,9 \times 10^5$ g mol⁻¹ obtida e sua viscosidade intrínseca corresponde aos valores obtidos por Kasaai et al., (2000).

4.1.2 Preparo dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados na concentração inicial de 1 mmol L^{-1} e submetidos ao teste de sonicação, uma vez que o tempo de sonicação interfere na homogeneidade e controle do diâmetro da partícula (DUA et al., 2012). Durante o preparo das alíquotas, as amostras foram sonicadas em banho de gelo para controle de temperatura e evitar o aquecimento ao sonicar.

Como é possível observar na Figura 11, a sonicação reduziu o diâmetro hidrodinâmico (D_h) dos lipossomas de $344 (\pm 10) \text{ nm}$ (sem sonicar) para $83 (\pm 2) \text{ nm}$ (tempo 3 minutos). Após o tempo de 3 minutos, o D_h dos lipossomas sofreu um aumento, chegando a 660 nm . Este comportamento também foi observado em lipossomas contendo DNA por Wasan et al. (1996), em que os lipossomas apresentaram diâmetros semelhantes até 3 minutos de sonicação, aumentando o diâmetro quando sonicados por 6 minutos, onde este fato foi atribuído a aglomeração das partículas.

FIGURA 11 – ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO DIÂMETRO DO LIPOSSOMA DODAB 1 mmol L^{-1} POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO MEDIANTE SONICAÇÃO NOS TEMPOS 0 A 5 MINUTOS.

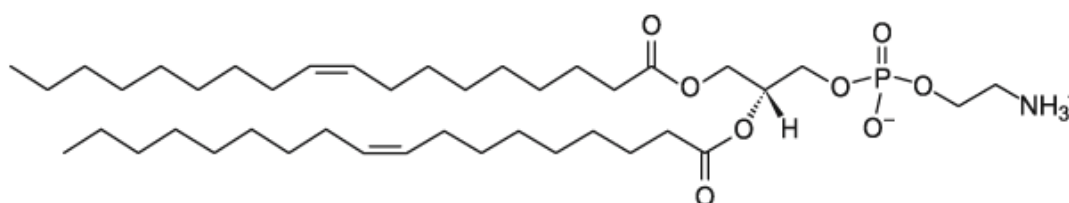


FONTE: O autor (2019).

Portanto, com a intenção de padronizar o tamanho dos lipossomas formados, para a continuidade dos experimentos, o tempo de 3 minutos de sonicação pós ressuspensão foi utilizado.

Para o desenvolvimento dos experimentos, os lipossomas foram desenvolvidos na concentração de 5 mmol L⁻¹ de DODAB e 5 mmol L⁻¹ de DODAB com 1,2 dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) (FIGURA 12), co-surfactante utilizado para estabilização da bicamada do lipossoma, na concentração 10:1, comparando-os em suas caracterizações a fim de selecionar o lipossoma adequado para ser usado no estudo de permeação cutânea.

FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO DOPE



FONTE: O autor (2019).

Para melhor entendimento do processo, lipossomas formados apenas com DODAB serão chamados de Lip, enquanto lipossomas estabilizados com DOPE serão chamados de LipD.

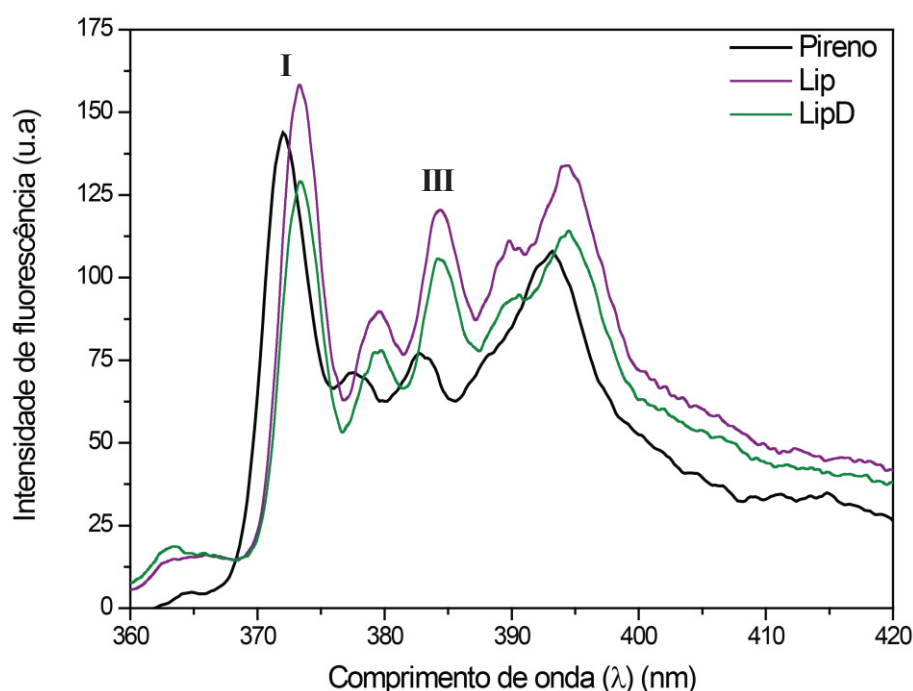
4.1.3 Determinação da formação de ambientes hidrofóbicos nos lipossomas

A sonda de pireno pode ser usada para avaliar a formação de estruturas micelares e agregados que apresentem (nano ou micro) domínios apolares em sua estrutura. O pireno é um hidrocarboneto aromático policíclico fluorescente que, quando excitado, emite 5 bandas vibrônicas dependentes do solvente. Dentre as bandas vibrônicas emitidas pelo pireno, é possível destacar que, na presença de solventes polares ocorre um aumento de intensidade da banda I com consequente redução da emissão de outras bandas, como por exemplo a banda III (KALYANASUNDARAM; THOMAS, 1977). Com isso, é considerado que a emissão da banda I corresponde a presença de domínios hidrofílicos e a banda III, a domínios hidrofóbicos no sistema.

Devido a sua afinidade, a migração do pireno ocorre em direção ao domínio apolar destes agregados, permitindo sua utilização como uma sonda

(VANDERKOOI; CALLIS, 1974), onde as variações da razão de intensidade destas duas bandas (I/III) pode determinar a migração do pireno e a penetração de água em estruturas micelares (KALYANASUNDARAM; THOMAS, 1977).

FIGURA 13 – ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM LIPOSSOMAS DE DODAB (Lip) E LIPOSSOMAS DODAB:DOPE (LipD)



FONTE: O autor (2019).

A alteração do espectro de fluorescência da sonda de pireno fornece informações sobre a polaridade do ambiente formado. A razão de intensidade entre as bandas I/III (FIGURA 13), na solução de pireno foi de 1,87, reduzindo quando em contato com o Lip e LipD para 1,31 e 1,22 respectivamente. Esta redução é explicada pela formação de ambientes hidrofóbicos do lipossoma, onde o pireno migra do solvente aquoso para o interior da bicamada lipídica, aumentando a intensidade da banda III (BURKE et al., 2001) em relação a banda I, que não sofreu reduções significativas. Esta alteração não indica apenas que as moléculas de pireno interagiram com a bicamada lipídica do lipossoma (aumentando a intensidade da banda III), mas demonstra que moléculas de pireno também se encontram nos ambientes aquosos do interior do lipossoma.

A utilização da sonda fluorescente para determinar a formação dos ambientes hidrofóbicos foi realizada em estruturas micelares, onde, acima da concentração micelar crítica, a razão das bandas III/I aumentou de 0,66 para 0,90,

contribuindo para a comprovação de formação das micelas (KALYANASUNDARAM; THOMAS, 1977).

4.1.4 Revestimento e caracterização dos lipossomas

Estruturas coloidais são envoltas a uma camada de contraíons ligados as cargas de superfície, onde também há a presença de água, tanto na forma livre como hidratando esta camada, conhecida como camada de Stern. Além desta camada, os contraíons remanescentes na solução são submetidos a forças opostas de atração e repulsão que, quando em equilíbrio, resultam em uma segunda camada de cisalhamento. O potencial zeta de uma suspensão coloidal é o potencial elétrico no plano de cisalhamento entre as partículas e solvente (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997).

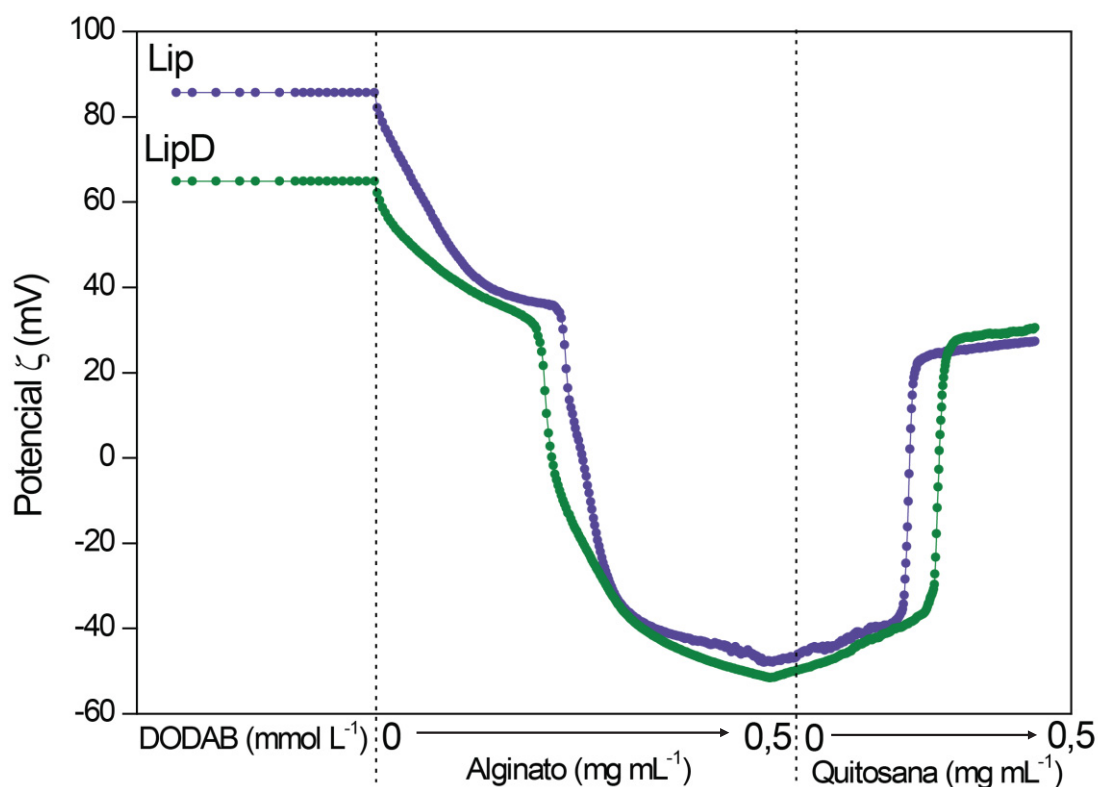
O revestimento foi realizado buscando a inversão do potencial elétrico de superfície do lipossoma a cada deposição de camadas polieletrólíticas poliméricas. A medida que a solução de ALG (1 mg mL^{-1}) foi adicionada a solução de lipossomas, interações eletrostáticas, junto com outras interações hidrofílicas do tipo ligação de hidrogênio e hidrofóbicas como forças de Van der Waals, permitem que ocorra a deposição do polímero de carga negativa sobre a carga positiva do DODAB, invertendo este potencial para negativo (FIGURA 14), configurando a primeira camada de revestimento.

Com a estabilização do potencial elétrico negativo com a adição do alginato, a segunda camada polimérica de quitosana (1 mg mL^{-1}) foi adicionada, até inversão e estabilização do potencial elétrico positivo.

É possível observar que na primeira camada de revestimento, a deposição do alginato ocorre em duas etapas, devido a presença de oligossacarídeos de baixa massa molar, que apresentam difusão mais rápida comparado às outras frações do alginato. A primeira camada de revestimento ocorre de forma lenta quando comparada a adição da segunda camada, onde a quitosana necessita de um volume menor para estabilizar o potencial elétrico (6 mL, enquanto o alginato utilizou 10 mL). Este fato ocorre devido ao revestimento ser dependente da adsorção entre a carga negativa com a carga positiva do DODAB, seguido de um relaxamento das cadeias poliméricas para formar uma estrutura compactada na superfície do lipossoma,

fortes o suficiente para não serem retirados com a lavagem e centrifugação (VILLIERS, DE et al., 2011).

FIGURA 14 – RELAÇÃO ENTRE POTENCIAL ζ DOS LIPOSSOMAS E O VOLUME DE ALGINATO DE SÓDIO E QUITOSANA (AMBOS 1 mg mL^{-1} EM TAMPÃO ACETATO $0,01 \text{ MOL L}^{-1}$ pH 4,72) ADICIONADOS PARA O REVESTIMENTO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LAYER-BY-LAYER



FONTE: O autor (2019).

Este relaxamento das cadeias do alginato resulta numa barreira à saturação da superfície do lipossoma, adsorvendo mais polímero na superfície e a partir disso, a segunda camada de revestimento não ocorre de forma estequiométrica, já que o alginato possui vários locais eletrostáticos para a ligação, enquanto com a quitosana, a saturação do sistema aumenta, reduzindo os locais de ligação entre as cargas, reduzindo o volume de quitosana na superfície (VILLIERS, DE et al., 2011).

Conhecendo a inversão do potencial e os volumes necessários para o revestimento polimérico, a técnica de *LbL* foi realizada, com a incorporação dos lipossomas em uma solução de excesso polimérico e a cada etapa de revestimento o potencial ζ foi determinado, para comprovar a inversão de potencial e a estabilidade do sistema (TABELA 4), onde, lipossomas revestidos com alginato serão chamados de Lip-A/LipD-A e lipossomas revestidos com uma camada de alginato seguida de uma camada de quitosana serão chamados de Lip-C/LipD-C. Os

valores obtidos de potencial ζ demonstram que, com a metodologia de *LbL* a inversão de potencial ocorre à medida que a deposição de um polímero de carga oposta se adsorve na superfície.

TABELA 4 – VALORES DE POTENCIAL ZETA (Potencial ζ) DAS AMOSTRAS DE LIPOSSOMAS (Lip/LipD) E LIPOSSOMAS REVESTIDOS (Lip-A/LipD-A/Lip-C/LipD-C) DILUÍDOS 1:200 EM ÁGUA MILLI-Q FILTRADA

| Amostra | Potencial ζ (mV) | Amostra | Potencial ζ (mV) |
|---------|------------------------|---------|------------------------|
| Lip | $79 \pm 0,4$ | LipD | $62 \pm 1,5$ |
| Lip-A | $-52 \pm 0,2$ | LipD-A | $-68 \pm 0,3$ |
| Lip-C | $39 \pm 0,3$ | LipD-C | $48 \pm 0,3$ |

FONTE: O autor (2019).

O potencial elétrico auxilia na determinação da estabilidade coloidal. Quando mais o valor de ζ se aproxima de 0, menor a repulsão entre as partículas, favorecendo a agregação e separação de fases, como a coagulação (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997). Portanto, os valores obtidos, além de demonstrar o revestimento do lipossoma, indicam estabilidade à estrutura.

Para contribuir com a análise de potencial zeta, foram realizados os espectros de infravermelho por reflectância total atenuada (FTIR-ATR) dos polímeros isolados e de uma solução contendo alginato e quitosana numa relação 1:1, simulando a interação eletrostática entre estes polímeros na superfície do revestimento.

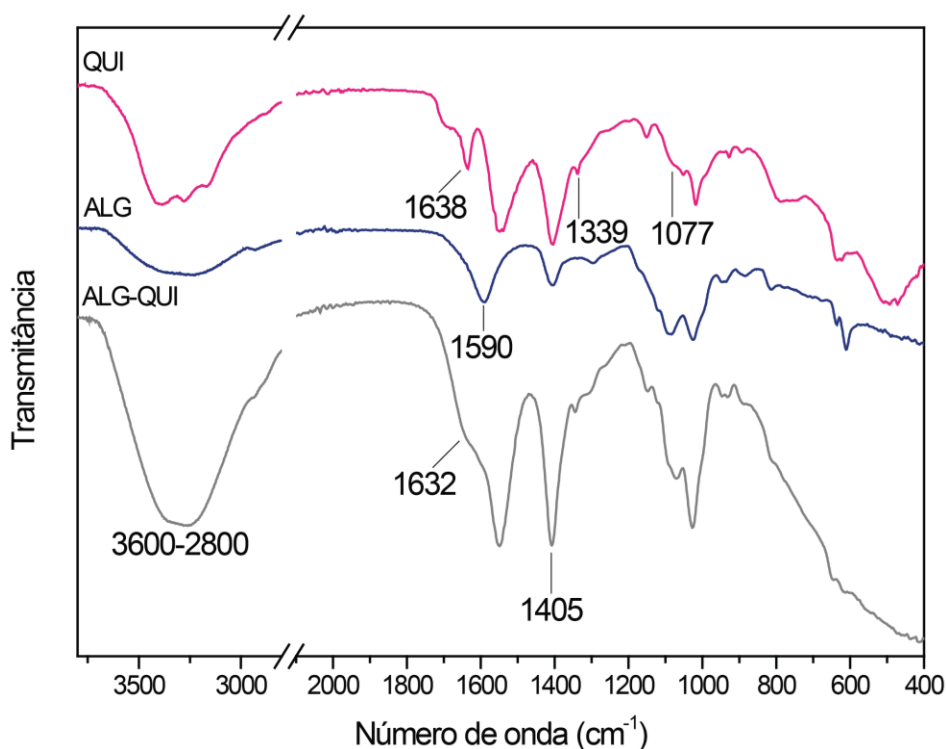
Observando o espectro na Figura 15, referente ao ALG, podem ser destacados as seguintes bandas: na região de $3600\text{-}2960\text{ cm}^{-1}$, devido a deformação axial de O-H com ligação de hidrogênio; na região de 1590 cm^{-1} , que tem como característica a deformação axial assimétrica de carboxilato (SILVERSTEIN et al., 2005).

Na Figura 15, o espectro da QUI mostra a banda na região de 1638 cm^{-1} , correspondente a deformação axial C=O de amida, 1339 cm^{-1} referente a deformação axial de C-N de amina, e a banda na região de 1077 cm^{-1} cuja característica é de vibrações de estiramento da ligação C-O-C que unifica as unidades do esqueleto da glucosamina (KUMAR et al., 2012).

No espectro da solução de ALG-QUI, notou-se a presença das bandas características dos polímeros isolados, bem como deslocamentos referentes a interação eletrostática, descritos na Tabela 5. A banda presente na região de $3700\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ da solução de ALG-QUI, refere-se à deformação axial de O-H com ligação

de hidrogênio sobreposta com a região de vibração da deformação axial de N-H de amina. O fato desta banda apresentar uma intensidade forte e larga é explicada pela ligação de hidrogênio que ocorre entre o O-H do ALG com a N-H da amina da QUI, deslocando as bandas referentes a deformação do N-H (3396 , 3277 e 3159 cm^{-1}) para um maior número de onda (SILVERSTEIN et al., 2005).

FIGURA 15 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA OS POLÍMEROS QUITOSANA (QUI), ALGINATO (ALG) E UMA SOLUÇÃO DE ALGINATO E QUITOSANA (ALG-QUI)



FONTE: O autor (2019).

Na região de 1632 cm^{-1} , a interação de ALG-QUI apresenta uma banda do tipo ombro, devido ao deslocamento das bandas de 1638 cm^{-1} , característico de deformação axial C=O de amida da QUI e 1590 cm^{-1} , de deformação axial assimétrica de carboxilato do ALG. Também, é possível notar o aumento da intensidade da banda na região de 1405 cm^{-1} , através da sobreposição das bandas de deformação axial de C-O da carboxila com a deformação angular no plano do C-O-H (SILVERSTEIN et al., 2005).

TABELA 5 – BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR) OBSERVADAS NOS ESPECTROS DE ALGINATO (ALG), QUITOSANA (QUI) E UMA SOLUÇÃO DE ALGINATO E QUITOSANA (ALG-QUI)

| Número de onda (cm ⁻¹) | | | Atribuição |
|------------------------------------|--|----------------------|--|
| ALG | QUI | ALG-QUI | |
| 3600-2960 (f/l) | 3396 (m) 3277 (m) 3159 (m) 1638 (f) | 3700-2800 (F/l) | Deformação axial de N-H de amina + Deformação axial de O-H com ligação de hidrogênio |
| 1590 (m) | 1548 (m) | 1632 (o) 1548 (F) | Deformação axial C=O de amida Deformação axial assimétrica de carboxilato |
| 1405 (m) | 1405 (m) | 1405 (F) | Vibração de deformação angular do N-H da amida Sobreposição de bandas da deformação axial de C-O da carboxila + Deformação angular no plano do C-O-H |
| 1400 (f) | 1339 (f) 1077 (o) | 1339 (f) 1077 (o) | Deformação axial de CO ₂ ⁻ Deformação axial de C-N de amina Vibrações de estiramento da ligação C-O-C que unifica as unidades do esqueleto da glucosamina* |

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Intensidades: m: média, f: fraca e F: forte. Aparência: l: larga, o: ombro.

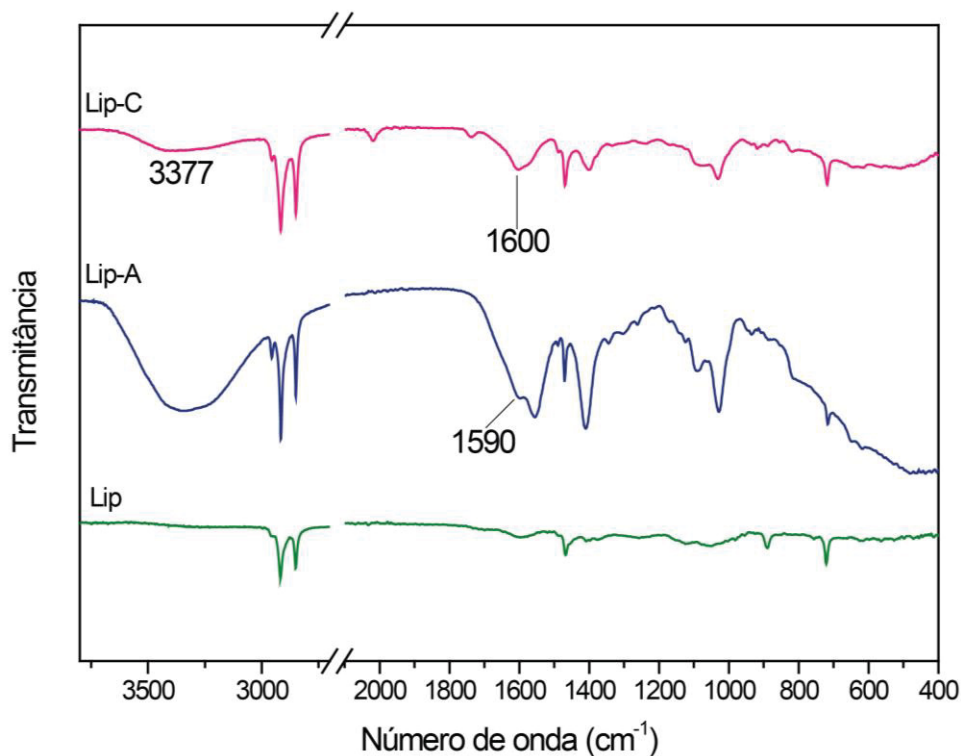
* Atribuição de Kumar et al., 2012

Os lipossomas e lipossomas revestidos também foram caracterizados por FTIR-ATR, onde os espectros obtidos podem ser observados na Figura 16. Em relação ao Lip, sem revestimento, notou-se a presença de bandas referentes à deformações de ligações C-H e C-H₂, simétricas e assimétricas (TABELA 6), devido a estrutura de cadeias longas de hidrocarbonetos do surfactante utilizado.

Nos lipossomas revestidos com alginato, Lip-A, ocorreu a diminuição da intensidade da banda referente a deformação axial assimétrica de carboxilato (1590 cm⁻¹) quando comparado com o polímero nativo, pois a vibração das bandas pode ter sido reduzida devido às fortes interações intermoleculares entre a cabeça polar do surfactante e os grupos carboxílicos alginato.

O espectro vibracional na região do infravermelho dos lipossomas revestidos assemelha-se em várias vibrações, uma vez que as estruturas dos dois polímeros apresentam funções orgânicas similares. Entretanto, nos Lip-C, é possível distinguir a presença das bandas nas regiões de 1600 cm⁻¹ e 3377 cm⁻¹, referentes às deformações axiais das ligações de N-H e deformações angulares da ligação de NH₃⁺ da quitosana (SILVERSTEIN et al., 2005).

FIGURA 16 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA ATENUADA (FTIR-ATR) PARA OS LIPOSSOMAS SEM REVESTIMENTO (Lip), LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM ALGINATO (Lip-A), E LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM ALGINATO E QUITOSANA (Lip-C)



FONTE: O autor (2019).

TABELA 6 – BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR) OBSERVADAS NOS ESPECTROS DOS LIPOSSOMAS (Lip) E DOS LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM ALGINATO (Lip-A) E REVESTIDOS COM ALGINATO E QUITOSANA (Lip-C)

| Número de onda (cm ⁻¹) | | | Atribuição |
|------------------------------------|------------|------------|--|
| Lip | Lip-A | Lip-C | |
| 3500-3000 (f/l) | | | Deformação axial simétrica e assimétrica da ligação C-H |
| | 3335 (F/l) | | Deformação axial da ligação O-H com ligação de hidrogênio |
| | | 3377 (f/l) | Deformação axial simétrica e assimétrica da ligação N-H |
| 2956 (o) | 2955 (f) | 2955 (f) | Deformação axial assimétrica da ligação C-H |
| 2915 (F/e) | 2915 (m) | 2915 (m) | Deformação axial assimétrica da ligação C-H |
| 2849 (F/e) | 2849 (m) | 2849 (m) | Deformação axial simétrica da ligação CH ₂ |
| | 1600 (o) | 1600 (f) | Deformação axial assimétrica do CO ₂ ⁻ |
| 1466 (f) | 1470 (f) | 1469 (f) | Deformação angular assimétrica e simétrica do NH ₃ ⁺ |
| | 1409 (m) | 1401 (f) | Deformação angular simétrica no plano do CH ₂ |
| 719 (f) | 719 (f) | 719 (f) | Deformação axial simétrica CO ₂ ⁻ |
| | | | Deformação angular assimétrica no plano do CH ₂ |

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Intensidades: m: média, f: fraca e F: forte. Aparência: l: larga, o: ombro, e: estreita.

Após caracterizado o revestimento, a determinação do tamanho dos lipossomas e lipossomas revestidos foi realizada por duas técnicas: microscopia de força atômica (AFM) e espalhamento de luz dinâmico (DLS).

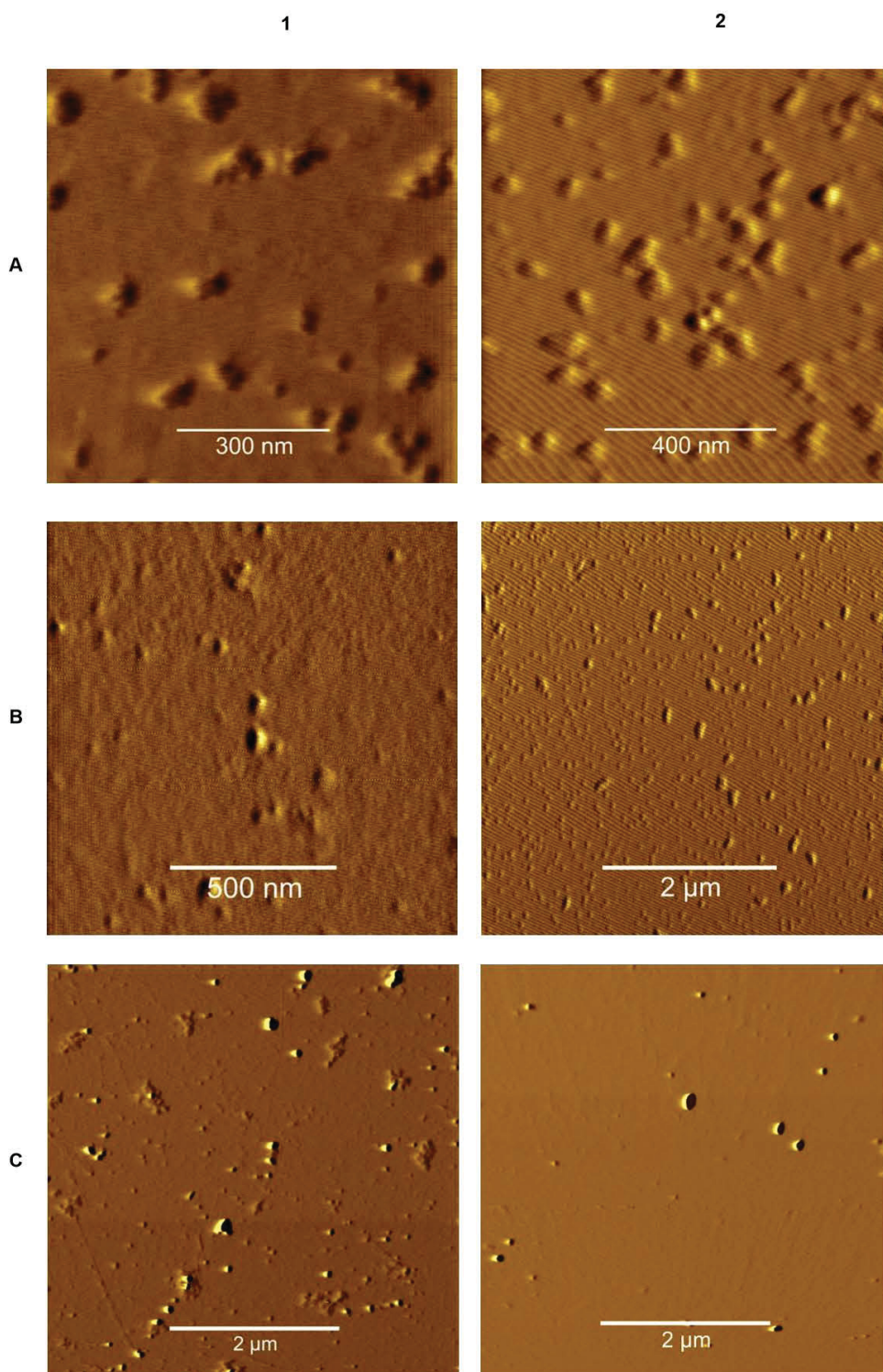
O AFM fornece diâmetro e topografia das partículas, sendo capaz de construir um “mapa” da superfície da amostra e identificar o tamanho de uma população depositadas sobre uma determinada área de mica, fazendo com que os dados obtidos sejam demonstrativos de uma parte da amostra.

Nas micrografias obtidas por AFM, a morfologia circular dos lipossomas é observada, condizente com a estrutura. A partir das micrografias, o diâmetro das partículas foi medido, obtendo os resultados da Tabela 7 e as micrografias podem ser observadas na Figura 17.

No DLS, a análise ocorre determinando a distribuição do tamanho das partículas em suspensão, devido a variação de intensidade do laser espalhado ao longo do tempo, que fornece informações sobre a movimentação de forma randômica das partículas de lipossoma, através do coeficiente de difusão destas partículas no solvente. Com este coeficiente de difusão, é possível determinar o diâmetro hidrodinâmico das partículas (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997).

Através da comparação do tamanho dos lipossomas por estas duas técnicas é possível observar que ambas são necessárias e complementares, pois o diâmetro obtido por DLS das partículas em solução é quantificado a partir do raio hidrodinâmico, portanto, além da partícula, há o plano de hidratação da mesma, enquanto no AFM, o diâmetro é calculado a partir de uma parte amostral de partículas secas (HOO et al., 2008). Pelos diâmetros determinados pelas duas técnicas, é adequado classificar o lipossoma obtido de LUV, já que os LUVs apresentam seu diâmetro entre 100 e 500 nm (SHARMA; SHARMA, 1997) Na literatura, os LUVs apresentam um diâmetro adequado para serem usados como sistema de entrega e liberação de fármacos (SZOKA; PAPAHAADJOPOULOS, 1980).

FIGURA 17 – MICROGRAFIAS DE AMPLITUDE DE LIPOSSOMAS (A), LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM ALGINATO (B), LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM ALGINATO E QUITOSANA (C) SENDO NA AUSÊNCIA (1) OU PRESENÇA (2) DE DOPE OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)



FONTE: O autor (2019).

Considerando os valores obtidos por DLS (TABELA 7), os lipossomas constituídos apenas por DODAB (Lip) não apresentaram diferenças estatísticas

(teste ANOVA com pós-teste Tukey) significativas em relação aos Lip-A, mas apresentaram diferenças com $p < 0,0001$ quando comparados com os Lip-C. Porém, quando comparando as diferenças de diâmetros entre as camadas, Lip-A e Lip-C mostraram-se diferentes ($p < 0,0001$). Comparando entre os LipD, quando revestidos, também apresentaram diferenças com $p < 0,0001$. Os Lip não apresentaram diferenças frente aos lipossomas contendo DOPE (LipD), de modo que é possível considerar que seus tamanhos foram próximos. Entretanto, quando comparando os revestimentos entre as duas composições de lipossomas, Lip-A/LipD-A apresentaram diferenças ($p < 0,0001$), enquanto Lip-C/LipD-C se mostraram se iguais ($p > 0,05$). Isso demonstra que lipossomas contendo DOPE não alteram o diâmetro quando revestidos com alginato ou quitosana. Quando analisado por um teste ANOVA com pós-teste Tukey, os lipossomas foram iguais pela técnica de AFM ($p > 0,05$).

TABELA 7 – DIÂMETROS DOS LIPOSSOMAS E LIPOSSOMAS REVESTIDOS OBTIDOS POR DLS E AFM (n=20)

| Amostras | AFM | DLS |
|----------------------|-------------|--------------|
| Lip ^a | 56 ± 8 nm | 66 ± 19 nm |
| Lip-A ^{*a} | 125 ± 68 nm | 104 ± 13 nm |
| Lip-C ^{*b} | 151 ± 24 nm | 204 ± 104 nm |
| LipD ^c | 63 ± 8 nm | 34 ± 4 nm |
| LipD-A ^{*d} | 172 ± 30 nm | 278 ± 36 nm |
| LipD-C ^{*e} | 165 ± 32 nm | 216 ± 96 nm |

FONTE: O autor (2019).

NOTA: Teste ANOVA com pós-teste Tukey. A significância estatística mostrada se refere aos controles (Lip e LipD). * = $p < 0,0001$; letras diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras de uma mesma composição.

Uma das limitações da técnica de AFM é que as pontas utilizadas não possuem tanta exatidão para delimitar os contornos da esfera lipossomal, obtendo valores que precisam ser comparados com outra técnica. Já para a técnica de espalhamento de luz, por tratar-se de amostras hidratadas, os polímeros presentes no revestimento incham-se.

Quando revestidos com a primeira camada de alginato, os lipossomas contendo DOPE (LipD) apresentam um aumento do D_H e ao incluir uma camada de quitosana, os valores obtidos para D_H encontram-se abaixo dos diâmetros com uma camada de revestimento. O alginato encontra-se em torno do lipossoma catiônico, onde nem todas suas cargas estão neutralizadas, fazendo com que o polímero interaja tanto com o lipossoma quanto com o solvente. Quando as cargas do

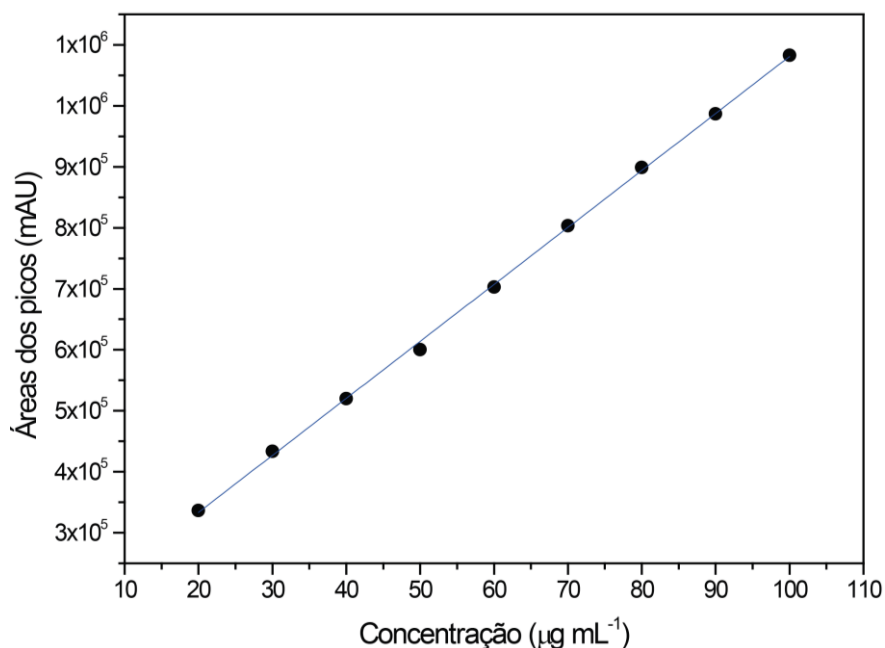
alginate interagem eletrostaticamente com as cargas da quitosana, ocorre uma desidratação e compactação desta camada de revestimento, devido a uma maior interação eletrostática das cadeias curtas do alginato com as cadeias longas da quitosana, reduzindo a hidratação e fazendo com que o lipossoma com ambos os polímeros apresente um diâmetro menor do que quando revestido apenas com o alginato, mas sem significância estatística ($p > 0,05$). Tal fato também foi observado por Haidar et al., 2008, onde o diâmetro de lipossomas revestidos com alginato-quitosana encontravam-se menores que lipossomas revestidos apenas com alginato, em uma estrutura semelhante a desenvolvida neste trabalho.

4.2 INCORPORAÇÃO DO EGF NOS LIPOSSOMAS

4.2.1 Purificação e quantificação do fator de crescimento epidermal

Como descrito anteriormente, o EGF utilizado neste trabalho é um peptídeo *like* lipossomado, portanto necessitou de uma etapa de purificação previamente descrita, onde utilizou-se um surfactante (Triton X-100) para lise do lipossoma existente e o peptídeo retirado foi sucessivamente lavado. Este peptídeo lipossomado não possuía concentração conhecida, já que não se trata de um padrão primário. Assim, para quantificá-lo, foi realizado uma curva de calibração com uma proteína de concentração conhecida, a albumina, no intuito de utilizar a albumina como molécula padrão para quantificação de proteínas de concentrações desconhecidas, neste caso o EGF purificado, a fim de correlacionar a concentração de EGF em unidades de albumina. Este tipo de metodologia é usada de forma semelhante aos métodos colorimétricos usados para quantificação de proteínas, onde a determinação por CLAE torna-se mais confiável que métodos colorimétricos comumente utilizados, reduzindo seu coeficiente de variação (BUCK et al., 1989; ORTON; DOUCETTE, 2013).

FIGURA 18 – CURVA PADRÃO DE ALBUMINA PARA QUANTIFICAÇÃO DE EGF POR CLAE-UV (COLUNA SYMMETRY C-18 A 40 °C, FASE MÓVEL 60% H₂O, 40% ACETONITRILA 0,1% TFA, TEMPO DE ELUIÇÃO 7 MINUTOS)



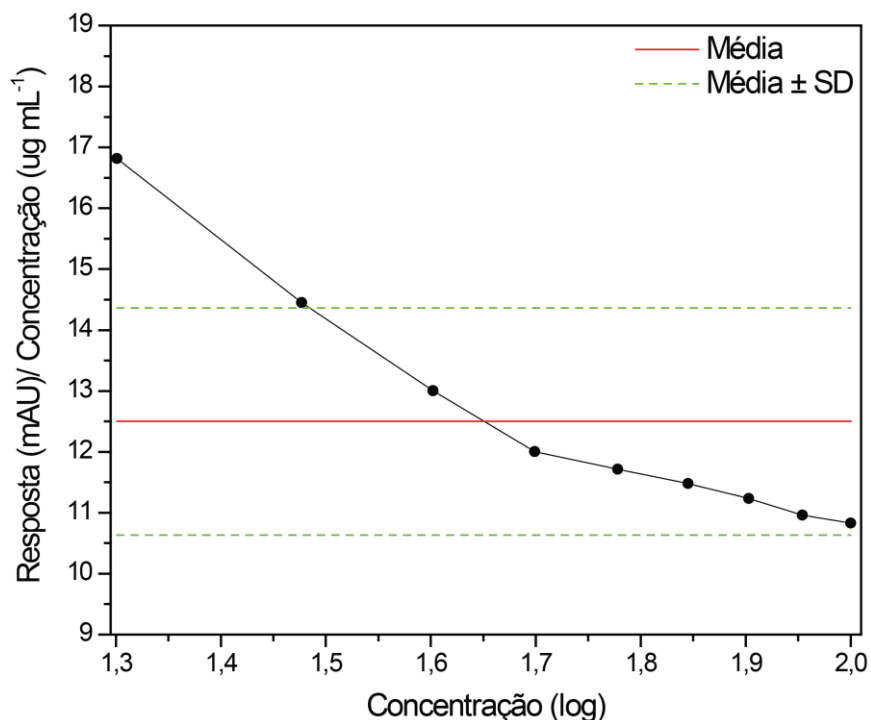
FONTE: O autor (2019).

A albumina apresentou tempo de retenção de 1,6 minutos (FIGURA 20A) anterior ao tempo de retenção do solvente cromatográfico (FIGURA 20C), devido ao fato de ser uma macromolécula que não apresente interação significativa com a fase estacionária da coluna C-18.

A curva de calibração obtida apresentou coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,9994 (FIGURA 18), equação de reta de $y = 9344,2x + 146550$ e o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base do desvio padrão do coeficiente linear da equação da reta (σ) e a média do coeficiente angular, desta mesma equação (s), sendo $LQ = 10 \sigma/s$ e $LD = 3,3 \sigma/s$. Os valores de LD e LQ foram de 19 e 59 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Para melhor visualização da possibilidade de utilização das concentrações para a construção da curva serem utilizadas posteriormente, a faixa linear dinâmica do método foi obtida através da interpolação de um gráfico das respostas relativas obtidas (FIGURA 19), onde a faixa de trabalho utilizada foi de 30 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

FIGURA 19 – RAZÃO SINAL/CONCENTRAÇÃO VS CONCENTRAÇÃO EM ESCALA LOGARÍTMICA PARA DETERMINAÇÃO DA FAIXA LINEAR DINÂMICA DE TRABALHO

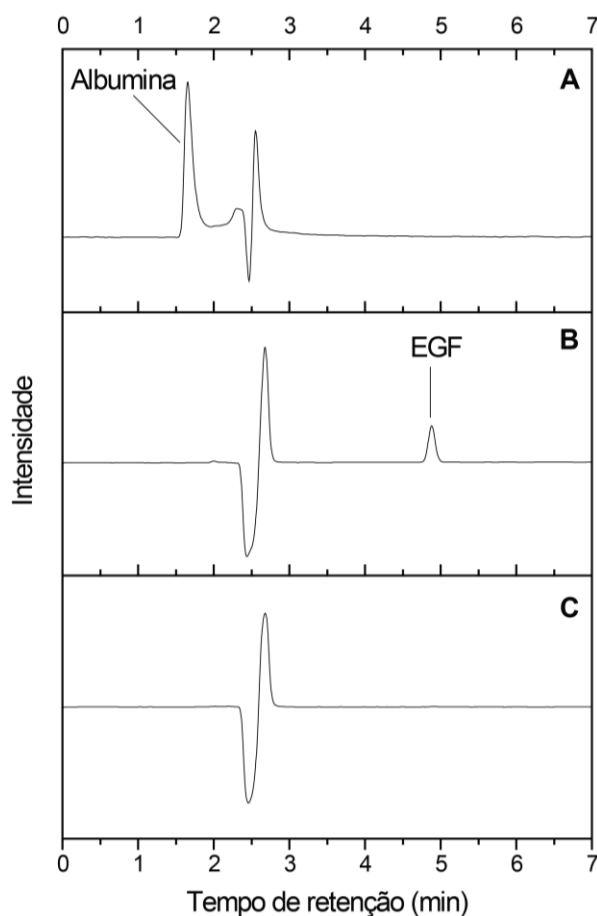


FONTE: O autor (2019).

Após a purificação, a concentração média obtida após de EGF foi de 5,0 mg mL⁻¹ em unidades de albumina, apresentando tempo de retenção de 4,8 minutos (FIGURA 20B), corroborando com o resultado de Kaminski et al., (2016). Desta forma, para encapsulação do fator de crescimento, a concentração utilizada neste trabalho foi de 50 µg mL⁻¹.

A purificação do EGF mostrou-se eficiente com a adição do Triton. Para excluir a influência do surfactante na purificação e uma possível contaminação posterior, realizou-se um cromatograma da injeção da solução de Triton X-100 6%, demonstrando que não há presença do mesmo na solução purificada de EGF, sem equivocar a concentração, uma vez que eles apresentam tempo de retenção diferentes e em comprimentos de ondas diferentes, em 280 nm, sendo que o triton apresentou tempo de retenção em 2,7 min, próximo à Karlsson et al. (2002). Nas injeções das soluções de EGF, os sinais referentes ao triton não aparecem.

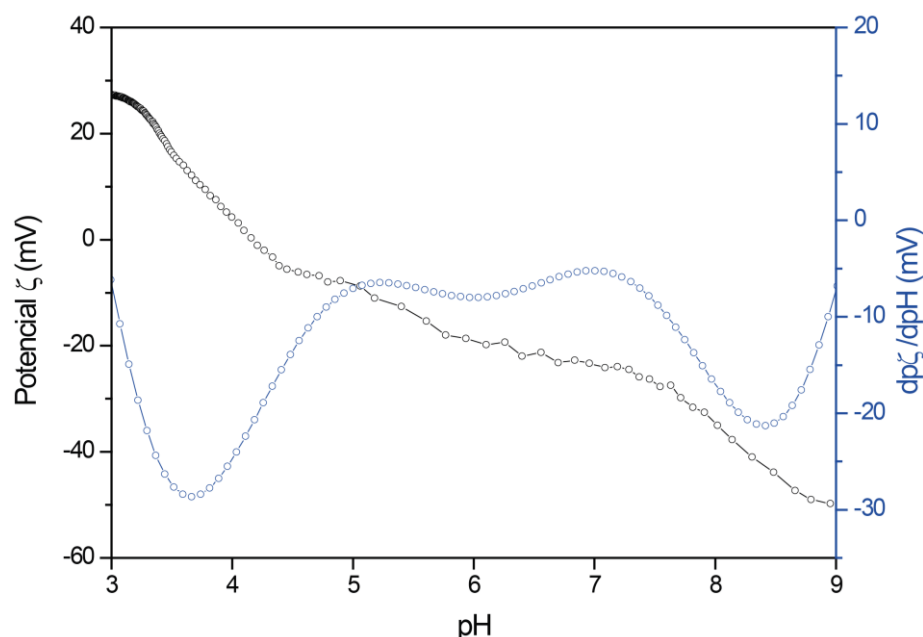
FIGURA 20 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA ALBUMINA (A), DO EGF PURIFICADO (B) E DO SOLVENTE CROMATOGRÁFICO (C) OBTIDO POR CLAE – UV ($\lambda = 210$ nm) (COLUNA SYMMETRY C-18 A 40 °C, FASE MÓVEL 60% H₂O, 40% ACETONITRILA 0,1% TFA, TEMPO DE ELUIÇÃO 7 MINUTOS)



FONTE: O autor (2019).

O ponto isoelétrico do EGF foi determinado por titulação potenciométrica do peptídeo, obtendo valor de 4,15 (FIGURA 21), semelhante ao encontrado na literatura (ALEMDAROĞLU et al., 2008). Neste pH, a molécula de EGF encontra-se com carga elétrica líquida zero ($\zeta=0$). Através da derivada $dp\zeta/dpH$ foram identificados dois pK_a s para o peptídeo, um em 3,5 associado aos grupos ácidos e outro em 8,5 associado aos grupos amino do peptídeo, valores próximos aos dos aminoácidos constituintes do EGF, como a metionina (2,28/9,21), glicina (2,34/9,60), arginina (2,17/9,04), tirosina (2,20/9,11) e cisteína (1,96/8,18) (CHUNG; KIM, 2010). A utilização do EGF em soluções de pH 6 (valor de pH próximo ao cutâneo) se deve, principalmente por sua estabilidade e interação com seus receptores nos endossomos (ALEMDAROĞLU et al., 2008) e ao fato do potencial elétrico de superfície do EGF ser negativo, favorecendo sua interação com a carga positiva do DODAB, facilitando sua encapsulação.

FIGURA 21 – DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DO EGF POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA



FONTE: O autor (2019).

4.2.2 Preparo dos LipE e eficiência de incorporação

A incorporação do EGF em diferentes concentrações foi realizada inicialmente nos lipossomas de DODAB 1 mmol L⁻¹. Os valores obtidos de eficiência de incorporação pelo método indireto foram muito baixos, uma vez que a maior parte da concentração de EGF encontrava-se no sobrenadante e não havia sido incorporado no interior do lipossoma (TABELA 8). Os lipossomas contendo EGF serão daqui para frente chamados de LipE (LipE-A com alginato e LipE-C com alginato e quitosana).

TABELA 8 – EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EGF EM LIPOSSOMAS DODAB 1 mmol L⁻¹ DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO INDIRETO POR CLAE.

| Concentração EGF ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | [EGF] não incorporado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Eficiência de Incorporação (%) |
|---|--|-----------------------------------|
| 10 | 10 | 0 |
| 50 | 46 | 8 |

FONTE: O autor (2019)

Com o intuito de aumentar a concentração incorporada de ativo, a concentração de DODAB nos lipossomas foi alterada para 5 e 10 mmol L⁻¹, utilizando a concentração de fármaco de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que apresentou a maior

incorporação no teste anterior. Com isso, a eficiência de incorporação aumentou para 20 e 42% respectivamente (TABELA 9).

TABELA 9 – EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DE EGF EM LIPOSSOMAS DODAB A 1, 5 E 10 mmol L^{-1} DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO INDIRETO POR CLAE

| Concentração DODAB (mmol L^{-1}) | [EGF] não incorporado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Eficiência de Incorporação (%) |
|--|--|-----------------------------------|
| 1 | 46 | 8 |
| 5 | 40 | 20 |
| 10 | 29 | 42 |

FONTE: O autor (2019).

A estrutura lipossomal é uma estrutura frágil, que pode ser afetada pela centrifugação realizada na metodologia. Sabendo disso e com a intenção de aumentar a incorporação do EGF no sistema, foi adicionado à formulação um lipídeo neutro, o DOPE e realizado o revestimento polimérico, para então realizar uma nova EI%. O revestimento polimérico aumentou a eficiência de incorporação, assemelhando a valores reportados em literatura (ALEMDAROĞLU et al., 2008; TSIRIGOTIS-MANIECKA et al., 2016) (TABELA 10).

Com a primeira camada de revestimento com ALG, houve um aumento da EI% que se mantém com a segunda camada de revestimento com QUI, indicando que a presença dos polímeros auxilia na retenção do ativo no interior da estrutura. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato de o EGF não ser incorporado no núcleo aquoso do lipossoma, mas sim na superfície das cadeias carbônicas dos lipídeos (DODAB:DOPE). No momento do revestimento, ocorre o aprisionamento do EGF no interior destas cadeias poliméricas, evitando sua liberação para o meio.

TABELA 10 – EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DE EGF EM LIPOSSOMAS DODAB:DOPE 5 mmol L^{-1} , DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO INDIRETO

| Lipossoma | Eficiência de Incorporação (%) |
|-----------|-----------------------------------|
| LipE-A | 55 |
| LipE-C | 55 |

FONTE: O autor (2019).

Determinações de eficiência de incorporação podem ser realizadas em método direto e indireto, onde o método direto consiste em lisar o precipitado obtido na determinação indireta e quantificar por CLAE. Entretanto, neste trabalho a determinação da EI de forma direta não foi possível de ser realizada, pois não houve

a quebra do revestimento polimérico para quantificação do EGF. Portanto, apenas os valores da EI indireta foram consideradas.

Os lipossomas 1 mmol L^{-1} tiveram seus diâmetros determinados por DLS. Seu D_H sem revestimento foi de $131 \pm 15 \text{ nm}$, enquanto que com alginato o diâmetro aumentou para $193 \pm 26 \text{ nm}$ e revestido com alginato e quitosana o diâmetro foi para $347 \pm 80 \text{ nm}$. O aumento da concentração de DODAB para 5 mmol L^{-1} , bem como quando esta concentração foi estabilizada com DOPE na composição do lipossoma, foi capaz de reduzir o tamanho dos lipossomas, cujos valores obtidos encontram-se na Tabela 7, e melhorar a incorporação do EGF.

O D_H dos lipossomas de 5 mmol L^{-1} de DODAB com DOPE foi também determinado após o encapsulamento do EGF, e apresentaram diâmetros de $127 \pm 3 \text{ nm}$ sem revestimento e os mesmos diâmetros quando revestidos, de modo que a incorporação do EGF não altera o tamanho dos lipossomas revestidos.

4.3 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO E ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

4.3.1 Estudo de permeação cutânea *in vitro*

Com a comparação realizada entre os resultados obtidos dos lipossomas (Lip) e lipossomas contendo DOPE (LipD), o LipD apresentou melhores resultados em relação à sonda de pireno, melhor inversão de potencial zeta, demonstrando melhor estabilidade, além de melhorar a eficiência de encapsulamento do EGF, sem alterações significativas de tamanho da estrutura. Com isso, o lipossoma contendo DODAB:DOPE (LipD) foi o lipossoma de escolha para realizar as análises biológicas de permeação na pele suína.

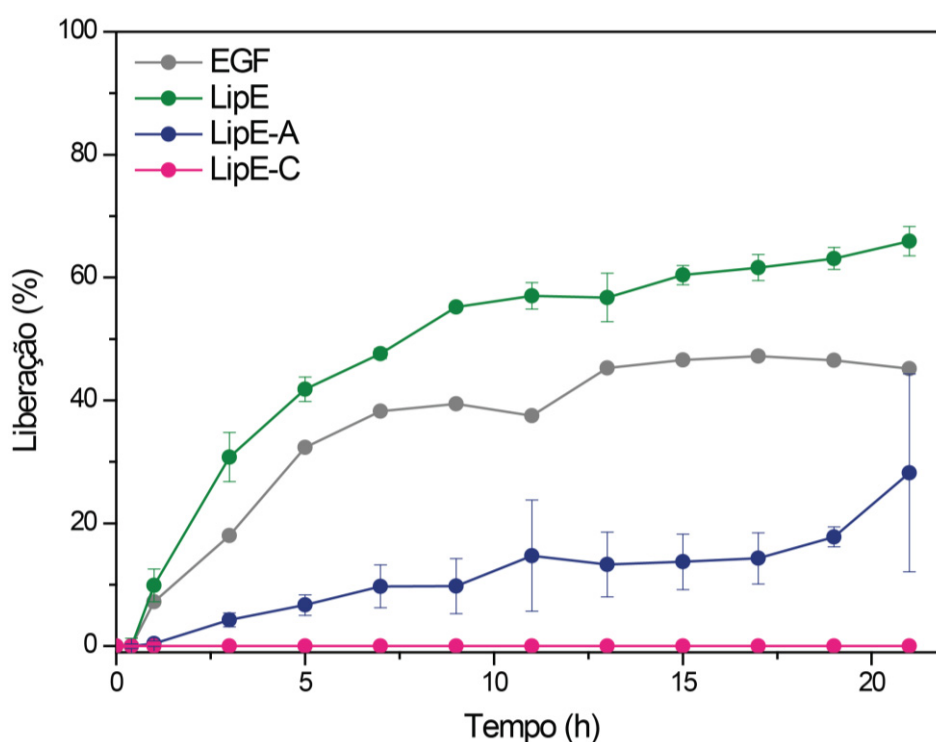
O experimento baseia-se no processo de difusão passiva dos lipossomas por um gradiente de difusão através da pele suína, com a passagem da estrutura de interesse do compartimento doador para o receptor, sem que haja equilíbrio entre os dois compartimentos, conferindo um regime de dose infinita ao experimento (MOSS et al., 2015). Para garantia da padronização do volume de cada célula de Franz, as mesmas foram calibradas em relação ao volume, obtendo um valor médio de $5,95 \text{ mL}$ (ANEXO I).

4.3.2 Cinética de liberação

Para avaliar o perfil de liberação da solução de EGF e lipossomas e lipossomas revestidos contendo EGF, foi realizado o teste de cedência em aparato de Franz. O perfil de liberação pode ser visualizado na Figura 22.

A quantidade relativa liberada no meio foi calculada com base na concentração real encapsulada determinada pela eficiência de incorporação. A solução de EGF e lipossomas sem revestimento obtiveram sua maior liberação de ativo nas 10h iniciais de experimento, atingindo um *plateau* de liberação de aproximadamente 54 e 75% respectivamente.

FIGURA 22 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DE EGF 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LIPOSSOMAS DODAB:DOPE E LIPOSSOMAS DODAB:DOPE REVESTIDOS CONTENDO EGF (LipE, LipE-A e LipE-C) EM MEMBRANAS DE ÉSTER DE CELULOSE COM SOLUÇÃO RECEPTORA TAMPÃO PBS EM APARATO DE CÉLULA DE FRANZ AO LONGO DE 21h



FONTE: O autor (2019).

O EGF isolado apresentou um perfil de liberação mais lento que lipossomado, uma vez que o lipossoma possui tamanhos menores que a proteína livre, melhorando seu perfil de liberação, aumentando a quantidade de EGF liberado em um mesmo período, liberando um máximo de 47% para o EGF livre e 65% para o lipossomado.

Com a adição da primeira camada de revestimento de alginato, o perfil de liberação mudou para um perfil de liberação menor e sustentada, atingindo o máximo de 28% em 21h. Lipossomas revestidos com a segunda camada de revestimento de quitosana não liberaram quantidades mensuráveis de EGF, uma vez que a interação entre os polímeros não permitiu a saída do EGF.

4.3.3 Permeação cutânea com peles suínas

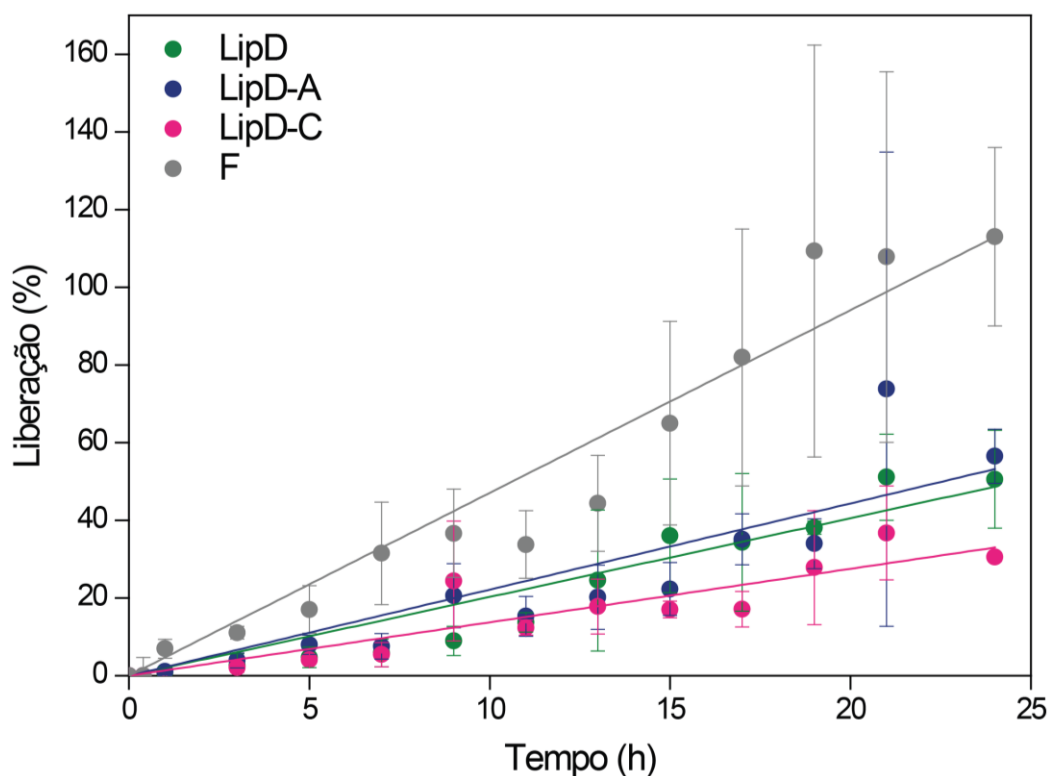
4.3.3.1 Permeação dos LipD contendo fluoresceína

O perfil de absorção da fluoresceína livre e lipossomada foi realizado em peles de orelhas suínas, onde os dados obtidos podem ser observados na Figura 23. As linhas de tendência do gráfico não possuem significado matemático, servindo apenas para uma referência visual e demonstrar o comportamento das amostras.

As tendências foram utilizadas uma vez que os perfis obtidos não se assemelharam a nenhum modelo experimental conhecido, pois modelos matemáticos utilizados para caracterizar um comportamento de permeação são desenvolvidos experimentalmente em peles humanas e peles sintéticas ou animais, mesmo que um bom substituinte para obtenção de informações quanto a difusão, permeação e absorção, não possuem o mesmo desempenho que peles humanas (KIRJAVAINEN et al., 1996).

A permeação da fluoresceína livre e lipossomada foi realizada como triagem do comportamento da estrutura lipossomal e seu revestimento sob a permeação cutânea. Ao observar a Figura 23, o comportamento dos lipossomas se assemelha, demonstrando uma leve tendência do lipossoma revestido com alginato apresentar uma maior absorção quando comparado aos outros dois. Ogiso et al. (2006), demonstrou com estudos histológicos que cargas negativas se difundem para a derme mais rápido que cargas positivas, através dos folículos, fazendo com que esta rápida penetração de sistemas negativamente carregados aumentam a capacidade de permeação, enquanto estruturas com cargas positivas acumulam-se no estrato córneo devido à interação com as cargas celulares.

FIGURA 23 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DE FLUORESCÉINA $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, LIPOSSOMAS DODAB:DOPE E LIPOSSOMAS DODAB:DOPE REVESTIDOS CONTENDO FLUORESCÉINA (LipD, LipD-A e LipD-C) EM MEMBRANAS DE PELES DE ORELHAS DE PORCO EM APARATO DE CÉLULA DE FRANZ AO LONGO DE 24h

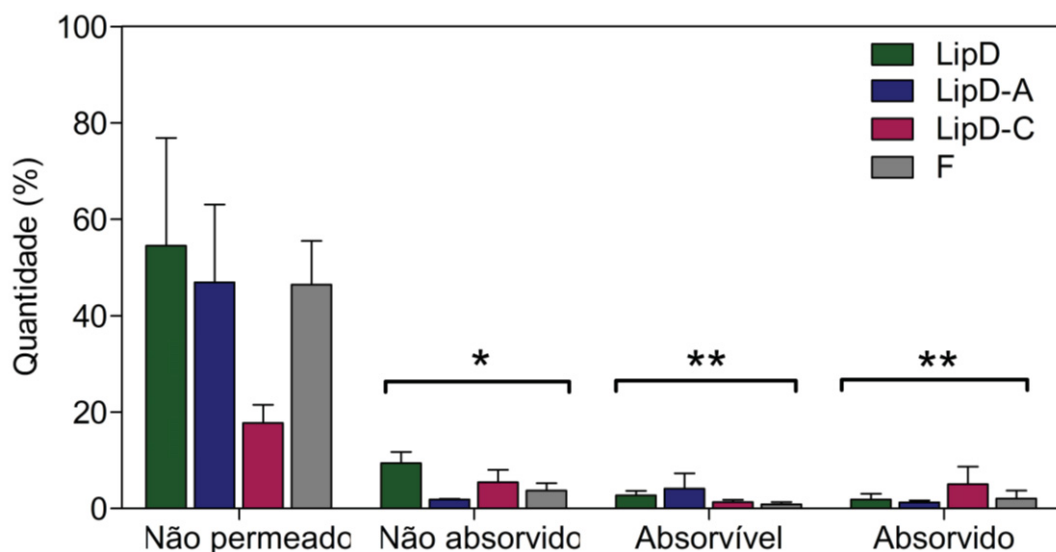


FONTE: O autor (2019).

Após o tempo de 24h do experimento de permeação, a dose não absorvida (lavada da superfície da pele), a dose absorvível (presente na pele) e a dose absorvida (conteúdo que atingiu o fluido receptor) foram quantificadas, como prevê a OECD, 2004 (FIGURA 24). A partir da fluorescência medida, analisando por teste ANOVA com pós-teste Tukey, não houve diferenças entre os lipossomas e a fluoresceína livre em relação à sua quantidade não absorvida. Entretanto, quando comparada a dose absorvível e a dose absorvida, houve diferenças estatísticas.

O fato dos lipossomas não terem permeado a pele é condizente com a literatura, onde agentes penetrantes hidrofílicos apresentam o estrato córneo como barreira principal à difusão (MOSS et al., 2015), de modo que a ausência de permeação total e acúmulo dos lipossomas acima da barreira do estrato córneo fornece ao lipossoma o perfil de ação local, onde o mesmo tem baixas taxas de difusão do ativo e reside acima da primeira barreira cutânea.

FIGURA 24 – QUANTIDADE DE FLUORESCÉINA DETERMINADA POR FLUORIMETRIA NAS CAMADAS DA PELE DE PORCO



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Teste ANOVA com pós-teste Tukey. A significância estatística mostrada se refere ao não permeado. * $p < 0,0002$. ** $p < 0,0001$.

Os lipossomas aderem-se no estrato córneo, onde podem ser desestabilizados, interagir e reduzir as interações intermoleculares da membrana lipídica celular, para penetrar e se difundir para outras camadas dérmicas, sem penetrar nas camadas granulares. O DOPE, co-surfactante utilizado para estabilizar as estruturas dos lipossomas, pode afetar a desestabilização do lipossoma formado, alterando a penetração dessa estrutura e posterior saída do ativo (KIRJAVAINEN et al., 1996).

Nota-se também, uma tendência de lipossomas carregados negativamente apresentarem uma difusão para o interior da epiderme, quando comparado com as cargas positivas, resultado já observado por Gillet; et al., 2011, que comparou o acúmulo de lipossomas na epiderme e na derme, onde a melhor penetração foi obtida quando o lipossoma possuía carga negativa 2,4 vezes quando comparado a lipossomas neutros.

4.3.3.2 Permeação dos LipD contendo EGF

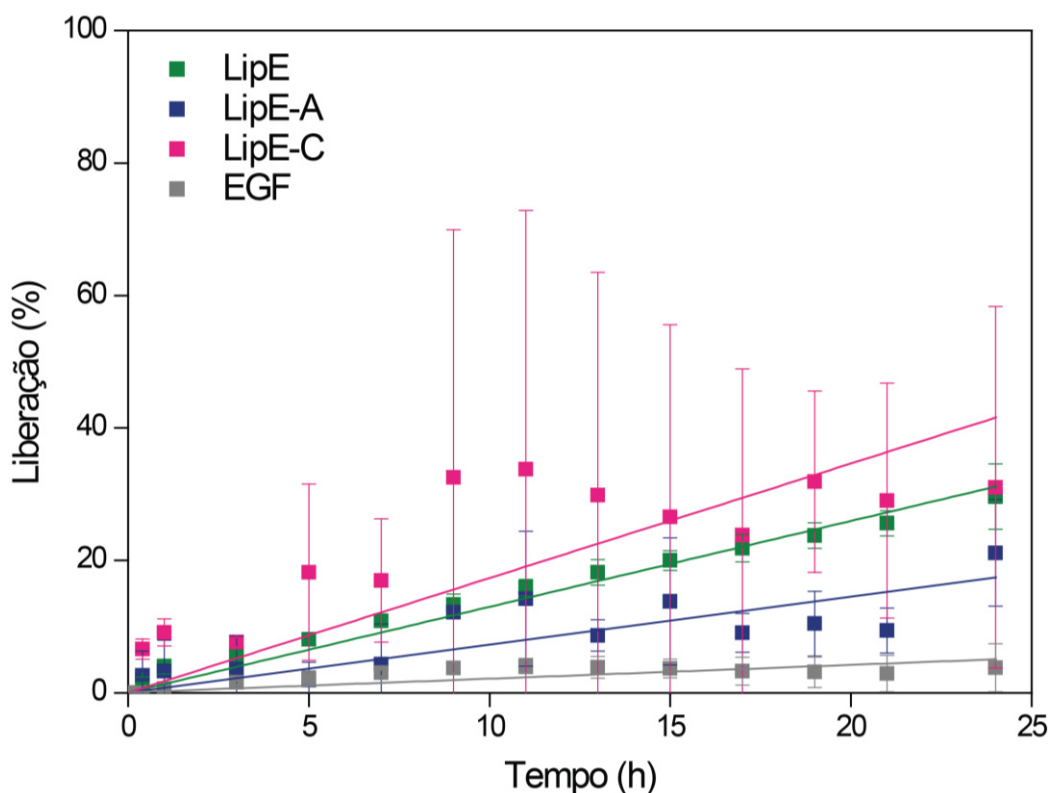
Quando realizado o mesmo experimento de triagem, encapsulando o ativo escolhido, o fator de crescimento epidermal, o perfil de liberação obtidos na pele (FIGURA 25) são diferentes em relação ao teste de cedência, que foi realizado em

membranas de diálise de éster de celulose. Enquanto no teste de cedência o EGF livre apresentou boa liberação, quando colocado em contato com a pele animal, apresentou baixas taxas de permeação. Além da composição diferente, a membrana de éster de celulose apresenta diâmetro de poro definida e controlada, prevista para a passagem dos 3kDa do fator de crescimento. Enquanto na pele, os espaços intercelulares são menores que este tamanho e a interação da proteína com a superfície das células não ocorre facilmente devido à repulsão de cargas (DEĞİM et al., 2011), o que explica a diferença de perfil de liberação do EGF livre na pele,.

Quando encapsulado, o EGF tende a ficar aprisionado no interior de uma estrutura de tamanho nanométrico, cuja penetração nestes espaços é devido a carga positiva do DODAB, auxilia na vetorização do ativo, uma vez que o aumento da liberação do EGF lipossomado ocorreu em ambos os tipos de membrana testadas. Portanto, a encapsulação do EGF em lipossomas torna-se interessante para promover a penetração deste fármaco que demonstrou uma baixa penetração intrínseca, menor de 10%.

Em relação aos lipossomas, o lipossoma revestido com quitosana apresentou maior permeação, oposto ao perfil obtido na membrana de diálise. A permeação cutânea dos lipossomas se mostrou baixa e sustentada, onde também não se adequou a nenhum modelo matemático existente. Mesmo com valores máximos de permeação de 40%, lipossomas com cargas positivas, como o LipE e LipE-C, revestido com quitosana, apresentaram perfis melhores de permeação quando comparado com o EGF e o LipE-A, revestido com alginato, onde ambos possuem cargas negativas no pH 6 utilizado. O teste de cedência sugeriu um perfil de liberação dos lipossomas em uma membrana neutra, onde não haveria influência de cargas e de composição celular. Quando inserido em um sistema contendo células epidermais, taxa hidratação e composição diferentes, o perfil obtido torna-se mais próximo ao que poderia ocorrer em células humanas (GILLET; COMPÈRE; et al., 2011; GILLET; LECOMTE; et al., 2011).

FIGURA 25 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DE EGF 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LIPOSSOMAS DODAB:DOPE E LIPOSSOMAS DODAB:DOPE REVESTIDOS CONTENDO EGF (LipE, LipE-A e LipE-C) EM MEMBRANAS DE PELES DE ORELHAS DE PORCO EM APARATO DE CÉLULA DE FRANZ AO LONGO DE 24h



FONTE: O autor (2019).

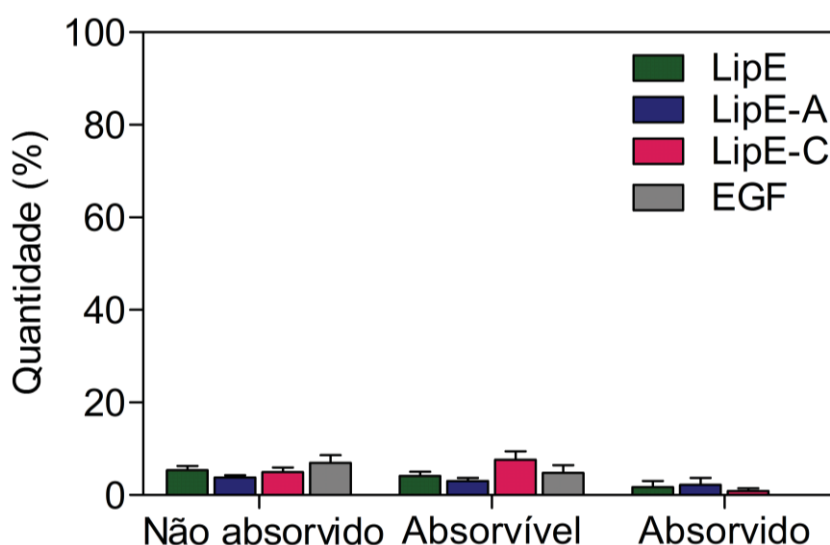
Ao tornar a carga de superfície negativa, com uma camada de revestimento de alginato, este perfil de permeação diminui e aumenta com a contribuição de carga positiva da quitosana. A diferença de perfil obtida em relação ao experimento realizado com a permeação cutânea da fluoresceína ocorre principalmente na permeação de lipossomas revestidos com quitosana. Os perfis dos outros dois lipossomas mantiveram-se próximos, devido aos grandes desvios padrões obtidos. A capacidade de interação e melhora na permeação cutânea oferecida pela quitosana pode ter contribuído para, quando em contato à pele animal, promover uma melhor permeação.

Gillet e Compère et al. (2011) demonstraram que para lipossomas formados com surfactantes negativamente carregados, as propriedades físico-químicas do fármaco importam na penetração da epiderme, em que para lipossomas contendo os mesmos constituintes, o encapsulamento de betametasona e dipropionato de betametasona mostraram comportamentos diferentes. Comparando os lipossomas

com fluoresceína e EGF revestidos com alginato, para uma mesma composição, ambos mostraram diferentes comportamentos na permeação cutânea.

Quando visualizados as quantidades de EGF retidos nas camadas da pele (FIGURA 26), os valores não foram estatisticamente diferentes. O método de quantificação por cromatografia líquida não se mostrou capaz de estimar valores tão baixos, pois encontram-se abaixo do limite de detecção, dificultando a determinação precisa da quantidade de EGF presente na pele. Comparativamente, a sonda de fluorescência utilizando fluoresceína permitiu que valores em escala de ng mL^{-1} pudessem ser medidos, de modo que as pequenas concentrações de ativos permeados ou retidos na superfície cutânea foram quantificadas.

FIGURA 26 – QUANTIDADE DE EGF DETERMINADA POR CLAE NAS CAMADAS DA PELE DE PORCO



FONTE: O autor (2019).

Com os dados obtidos é possível sugerir que, mesmo seguindo uma tendência onde cargas positivas (LipD/LipD-C) interagem melhor com o estrato córneo, e possuírem um melhor perfil de permeação cutânea, enquanto cargas negativas (LipD-A) interagem melhor com a epiderme, não é possível confirmar este dado com os resultados obtidos até então, devido ao grande desvio padrão obtido nas análises. Esta alta variabilidade ocorre uma vez que, mesmo mantendo o diâmetro das peles em um tamanho aproximado, não foi possível garantir a uniformidade da espessura, o que pode alterar a permeação em relação as triplicatas realizadas, mesmo que sua integridade fosse garantida pela medição da

perda de água transepidérmica e os valores encontrados ($8,67 \pm 0,2 \text{ g m}^{-2}\text{h}^{-1}$) são próximos dos preconizados pela OECD, 2004 de $10 \text{ g m}^{-2}\text{h}^{-1}$ (GUTH et al., 2015).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os polímeros utilizados neste trabalho foram purificados e caracterizados por cromatografia de exclusão de tamanho, ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho. Os lipossomas catiônicos produzidos com DODAB e DODAB:DOPE foram revestidos com ALG e QUI pela técnica de *Layer-by-layer*, (*LbL*), onde foram caracterizados pela medição da inversão potencial zeta e a interação dos polímeros foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho. Com a inversão do potencial zeta e a presença de bandas referentes aos polímeros nos lipossomas revestidos, o revestimento realizado foi bem-sucedido. Os lipossomas e lipossomas revestidos tiveram seus diâmetros quantificados por DLS e AFM, onde os lipossomas com e sem DOPE apresentaram-se próximos em seus diâmetros hidrodinâmicos, mas quando revestidos, apresentaram diâmetros maiores, devido a presença dos polímeros. A incorporação do fator de crescimento epidermal foi realizada e o revestimento com os polímeros promoveu o aumento da eficiência de incorporação de 20 para 55%, demonstrando que a presença do alginato e quitosana melhoraram a capacidade do lipossoma de incorporar o EGF.

Estes lipossomas foram testados frente à sua capacidade de permeação cutânea, tanto com uma sonda de fluorescência quanto com o encapsulamento do EGF. Ao permear a sonda de fluorescência, notou-se uma tendência de acúmulo destes lipossomas no estrato córneo, com um perfil de permeação lento e de liberação baixa. Na permeação do EGF, o lipossoma desenvolvido pode ser utilizado como entrega do fator de crescimento com ação local, uma vez melhorou a permeação comparado à solução de EGF livre, com um perfil de permeação baixo.

Os lipossomas catiônicos (sem revestimento e revestidos com quitosana) apresentaram a tendência de interagir com as cargas negativas do estrato córneo, enquanto lipossomas negativos difundem-se mais lentamente para a epiderme, sugerindo que o revestimento com quitosana melhore a permeação cutânea destes lipossomas.

REFERÊNCIAS

- AARSTAD, O. A.; TØNDERVIK, A.; SLETTA, H.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate sequencing: An analysis of block distribution in alginates using specific alginate degrading enzymes. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 1, p. 106–116, 2012.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5–28, 2004. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904003803?via%3Dihub>>. Acesso em: 14/5/2018.
- AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABADY, R.; DAVARAN, S.; JOO, S.; ZARGHAMI, N. Liposome : classification , preparation , and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 102, p. 1–9, 2013.
- ALEMDAROĞLU, C.; DEĞİM, Z.; ÇELEBI, N.; et al. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. **Burns**, v. 32, n. 3, p. 319–327, 2006. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417905002962?via%3Dihub>>. Acesso em: 25/6/2018.
- ALEMDAROĞLU, C.; DEGİM, Z.; CELEBI, N.; et al. Investigation of epidermal growth factor containing liposome formulation effects on burn wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 85, n. 1, p. 271–283, 2008.
- ALLEN, T. M.; HANSEN, C.; RUTLEDGE, J. Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 981, n. 1, p. 27–35, 1989. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005273689900783?via%3Dihub>>. Acesso em: 19/11/2018.
- ALLISON, A. C.; GREGORIADIS, G. Liposomes as immunological adjuvants. **Nature**, 1974.
- ALSARRA, I. A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 1, p. 16–21, 2009. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813009000646?via%3Dihub>>. Acesso em: 15/5/2018.
- ANAL, A. K.; STEVENS, W. F. Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, n. 1–2, p. 45–54, 2005. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517304006945?via%3Dihub>>. Acesso em: 5/6/2018.
- AUGST, A. D.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, n. 8, p. 623–633, 2006.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238-252, 1965. Academic Press. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283665800936?via%3Dihub>>. Acesso em: 14/5/2018.

BARROS, N. B. DE; MACEDO, S. R. A.; FERREIRA, A. S.; et al. Liposomes containing an ASP49-phospholipase A2 from Bothrops jararacussu snake venom as experimental therapy against cutaneous leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 225-231, 2016. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576916301606?via%3Dihub>>. Acesso em: 19/11/2018.

BARRY, B. . Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 101-114, 2001. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098701001671?via%3Dihub>>. Acesso em: 27/7/2018.

BITOUNIS, D.; FANCIULLINO, R.; ILIADIS, A.; CICCOLINI, J. Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, p. 1-11, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/archive/2012/738432/>>. .

BOHL KULLBERG, E.; BERGSTRAND, N.; CARLSSON, J.; et al. Development of EGF-conjugated liposomes for targeted delivery of boronated DNA-binding agents. **Bioconjugate Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 737-743, 2002.

BOWEY, K.; NEUFELD, R. Alginate microparticles produced by spray-drying for oral insulin delivery. , p. 4-7, 2008.

BROUSSIGNAC, P Chitosan: A natural polymer not well known by the industry. **Chimie et Industrie, Genie Chimique**. v. 99, n.9, p. 1241-1247, 1968.

BUCK, M. A.; OLAH, T. A.; WEITZMANN, C. J.; COOPERMAN, B. S. Protein estimation by the product of integrated peak area and flow rate. **Analytical Biochemistry**, v. 182, p. 295-299, 1989.

BURKE, S. E.; ANDRECYK, S. L.; PALEPU, R. Thermodynamic and aggregation properties of sodium dodecyl sulfate in aqueous binary mixtures of isomeric butanediols. **Colloid and Polymer Science**, v. 279, n. 2, p. 131-138, 2001.

CHEN, D.; COLE, D. L.; SRIVATSA, G. S. Determination of free and encapsulated oligonucleotides in liposome formulated drug product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, n. 5, p. 791-801, 2000.

CHUNG, Y.; KIM, Y. D. (19) United States. , v. 1, n. 19, 2010.

COSGROVE, T. **Colloid Science Principles, methods and applications**. 2 ed. ed.

2010.

DECHER, G.; ECKLE, M.; SCHMITT, J.; STRUTH, B. Layer-by-layer assembled multicomposite films. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 3, n. 1, p. 32–39, 1998. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029498800393#!>>. Acesso em: 11/10/2018.

DEĞİM, Z.; ÇELEBI, N.; ALEMDAROĞLU, C.; et al. Evaluation of chitosan gel containing liposome-loaded epidermal growth factor on burn wound healing. **International Wound Journal**, v. 8, n. 4, p. 343–354, 2011.

DOMENICI, F.; CASTELLANO, C.; DELL'UNTO, F.; CONGIU, A. Temperature-dependent structural changes on DDAB surfactant assemblies evidenced by energy dispersive X-ray diffraction and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 170–177, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.037>>. .

DRAGET, K. I.; SKJÅK BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, n. 1, p. 31–38, 1994. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0144861794901597>>. Acesso em: 4/6/2018.

DUA, J. S.; RANA, A. C.; BHANDARI, A. K. LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, v. 3, p. 14–20, 2012. Disponível em: <[https://www.technicaljournalsonline.com/ijpsr/VOL III/IJPSR VOL III ISSUE II APRIL JUNE 2012/Article 4 April June 2012.pdf](https://www.technicaljournalsonline.com/ijpsr/VOL%20III/IJPSR%20VOL%20III%20ISSUE%20II%20APRIL%20JUNE%202012/Article%204%20April%20June%202012.pdf)>. .

EGBARIA, K.; WEINER, N. Liposomes as a topical drug delivery system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 5, n. 3, p. 287–300, 1990a. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169409X9090021J>>. Acesso em: 14/5/2018.

EGBARIA, K.; WEINER, N. Liposomes as a topical drug delivery system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 5, n. 3, p. 287–300, 1990b. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169409X9090021J>>. Acesso em: 19/11/2018.

FEITOSA, E.; BROWN, W. Fragment and Vesicle Structures in Sonicated Dispersions of Dioctadecyldimethylammonium Bromide. **Langmuir**, v. 13, n. 18, p. 4810–4816, 1997. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la962034j>>. .
FRANZ, T. J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190–195, 1975. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15444835?via%3Dihub>>. Acesso em: 27/7/2018.

GACESA, P. Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, n. 3, p. 161–182, 1988.

Elsevier. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486178890001X>>. Acesso em:
 4/1/2019.

GAZORI, T.; KHOSHAYAND, M. R.; AZIZI, E.; et al. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 599–606, 2009. Elsevier. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861709000745>>. Acesso em: 4/6/2018.

GILLET, A.; COMPÈRE, P.; LECOMTE, F.; et al. Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1–2, p. 223–231, 2011. Elsevier B.V. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.049>>. .

GILLET, A.; LECOMTE, F.; HUBERT, P.; et al. Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 43–53, 2011. Elsevier. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S093964111100018X?via%3Dihub>>. Acesso em: 5/6/2018.

GRASDALEN, H. High-field, ¹H-N.M.R. spectroscopy of alginate: sequential: sequential structure and linkage conformations. **Carbohydrate Research**, v. 118, p. 255–260, 1983.

GUTH, K.; SCHÄFER-KORTING, M.; FABIAN, E.; LANDSIEDEL, R.; RAVENZWAAY, B. VAN. Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2015. Pergamon. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233314001714>>. Acesso em: 29/10/2018.

HAIDAR, Z. S.; HAMDY, R. C.; TABRIZIAN, M. Protein release kinetics for core–shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes. **Biomaterials**, v. 29, n. 9, p. 1207–1215, 2008. Elsevier. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961207009313>>. Acesso em: 8/8/2018.

HAN, F.; DONG, Y.; SONG, A.; YIN, R.; LI, S. Alginate/chitosan based bi-layer composite membrane as potential sustained-release wound dressing containing ciprofloxacin hydrochloride. **Applied Surface Science**, v. 311, p. 626–634, 2014. North-Holland. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433214011532>>. Acesso em: 8/8/2018.

HARDWICKE, J.; SCHMALJOHANN, D.; BOYCE, D.; THOMAS, D. Epidermal growth factor therapy and wound healing — past, present and future perspectives. **The Surgeon**, v. 6, n. 3, p. 172–177, 2008. Elsevier. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1479666X0880114X>>. Acesso

em: 4/1/2019.

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. Principles of colloid and surface chemistry. 3 ed, Taylor and Francis, 1997.

HONG, J. D.; LOWACK, K.; SCHMITT, J.; DECHER, G. Layer-by-layer deposited multilayer assemblies of polyelectrolytes and proteins: from ultrathin films to protein arrays. **Trends in Colloid and Interface Science VII**, v. 102, p. 98–102, 1993. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/BFb0118482>>. .

HOO, C. M.; STAROSTIN, N.; WEST, P.; MECARTNEY, M. L. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. SUPPL. 1, p. 89–96, 2008.

HUANG, Z.; LI, X.; ZHANG, T.; et al. Progress involving new techniques for liposome preparation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 4, p. 176–182, 2014. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087614000336>>. Acesso em: 14/5/2018.

INOH, Y.; NAGAI, M.; MATSUSHITA, K.; NAKANISHI, M.; FURUNO, T. Gene transfection efficiency into dendritic cells is influenced by the size of cationic liposomes/DNA complexes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, p. 230–236, 2017. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098717301574?via%3Dihub>>. Acesso em: 19/11/2018.

ISRAELACHVILI, J. N.; MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 470, n. 2, p. 185–201, 1977. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005273677900992>>. Acesso em: 20/6/2018.

JAKASA, I.; KEZIC, S. Evaluation of in-vivo animal and in-vitro models for prediction of dermal absorption in man. **Human and Experimental Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 281–288, 2008.

JEPPS, O. G.; DANK, Y.; ANISSIMOV, Y. G.; ROBERTS, M. S. Modeling the human skin barrier — Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 152–168, 2013. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12001226>>. Acesso em: 29/10/2018.

KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J. K. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 7, p. 2039–2044, 1977.

KAMINSKI, G. A. T.; SIERAKOWSKI, M. R.; PONTAROLO, R.; SANTOS, L. A. DOS; FREITAS, R. A. DE. Layer-by-layer polysaccharide-coated liposomes for sustained delivery of epidermal growth factor. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 129–135, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.014>>.

KARLSSON, G.; HINZ, A. C.; HENRIKSSON, E.; WINGE, S. Determination of Triton X-100 in plasma-derived coagulation factor VIII and factor IX products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 946, n. 1–2, p. 163–168, 2002.

KASAAI, M. R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 801–810, 2010. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861709006092>>. Acesso em: 1/10/2018.

KASAAI, M. R.; ARUL, J.; CHARLET, G. Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, p. 2591–2598, 2000.

KIRJAVAINEN, M.; URTTI, A.; JÄÄSKELÄINEN, I.; et al. Interaction of liposomes with human skin in vitro — The influence of lipid composition and structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1304, n. 3, p. 179–189, 1996. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005276096001269>>. Acesso em: 18/10/2018.

KUMAR, S.; KOH, J.; KIM, H.; GUPTA, M. K.; DUTTA, P. K. A new chitosan–thymine conjugate: Synthesis, characterization and biological activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 493–502, 2012. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813012000177>>. Acesso em: 27/12/2018.

LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; LIMAYEM-BLOUZA, I.; et al. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147–168, 2012. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/10.1166/jcsb.2012.1020>>.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 307–321, 1998. Elsevier Current Trends. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779998012207?via%3Dihub>>. Acesso em: 14/5/2018.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012. Pergamon. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670011000918>>. Acesso em: 3/12/2018.

MA, Z.; LIM, T. M.; LIM, L.-Y. Pharmacological activity of peroral chitosan–insulin

nanoparticles in diabetic rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, n. 1–2, p. 271–280, 2005. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517305000499>>. Acesso em: 4/6/2018.

MARQUEZ, L.; ABREU, F. A. M. DE; FERREIRA, C. L.; et al. Enhanced bone healing of rat tooth sockets after administration of epidermal growth factor (EGF) carried by liposome. **Injury**, v. 44, n. 4, p. 558–564, 2013.

MASUELLI, M. A. Mark-Houwink Parameters for Aqueous-Soluble Polymers and Biopolymers at Various Temperatures. **Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 37–43, 2014.

MENG, X.; TIAN, F.; YANG, J.; et al. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 5, p. 1751–1759, 2010.

MOSS, G. P.; GULLICK, D. R.; WILKINSON, S. C. Predictive methods in percutaneous absorption. **Predictive Methods in Percutaneous Absorption**, p. 1–199, 2015.

MYERS, D. **Surfaces, interfaces, and colloids**. 1999.

NAGARWAL, R. C.; KUMAR, R.; PANDIT, J. K. Chitosan coated sodium alginate–chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: In vitro characterization and in vivo study in rabbit eye. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, p. 678–685, 2012. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098712003065>>. Acesso em: 21/5/2018.

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method. , , n. April, 2004. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method_9789264071087-en>. .

OGISO, T.; YAMAGUCHI, T.; IWAKI, M.; TANINO, T.; MIYAKE, Y. Effect of Positively and Negatively Charged Liposomes on Skin Permeation of Drugs. , v. 9, n. 1, p. 4–7, 2006.

ORTON, D. J.; DOUCETTE, A. A. A universal, high recovery assay for protein quantitation through temperature programmed liquid chromatography (TPLC). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 921–922, p. 75–80, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.021>>. .

PARK, S. N.; JO, N. R.; JEON, S. H. Chitosan-coated liposomes for enhanced skin permeation of resveratrol. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 1481–1485, 2014. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X13003468>>. Acesso em: 3/12/2018.

PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 417–426, 2015. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641115003367?via%3Dihub>>. Acesso em: 19/11/2018.

PEARSON, A. S.; WOLFORD, R. W. MANAGEMENT OF SKIN TRAUMA. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 27, n. 2, p. 475–492, 2000. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095454305702086?via%3Dihub>>. Acesso em: 4/1/2019.

PICHETH, G. F.; PIRICH, C. L.; SANTOS, L. A. DOS; et al. Chitosan-coated microvesicles: Effect of polysaccharide-phospholipid affinity on decafluorobutane dissolution. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 169–175, 2016. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716308979?via%3Dihub>>. Acesso em: 10/5/2018.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: An indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063–1072, 2008.

RANGARI, A. T. Polymeric Nanoparticles Based Topical Drug Delivery: An Overview. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 05, n. 47, p. 05–12, 2015. Disponível em: <<http://www.jbiopharm.com/index.php/ajbps/article/view/718/pdf>>. .

RASOULIANBOROUJENI, M.; KUPGAN, G.; MOGHADAM, F.; et al. Development of a DNA-liposome complex for gene delivery applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 191–197, 2017. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117304575?via%3Dihub>>. Acesso em: 19/11/2018.

RECILLAS, M.; SILVA, L. L.; PENICHE, C.; et al. Thermoresponsive Behavior of Chitosan- g- N-isopropylacrylamide Copolymer Solutions. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1633–1641, 2009. Disponível em: <[http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm9002317%5Cnfile:///Users/HKB/Library/Application Support/Papers2/Articles/2009/Recillas/Biomacromolecules 2009 Recillas-1%5Cnpapers2://publication/doi/10.1021/bm9002317](http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm9002317%5Cnfile:///Users/HKB/Library/Application%20Support/Papers2/Articles/2009/Recillas/Biomacromolecules%202009/Recillas-1%5Cnpapers2://publication/doi/10.1021/bm9002317)>. .

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006. Pergamon. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670006000530?via%3Dihub>>. Acesso em: 21/5/2018.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P. LE. Characterization of chitosan. Influence of

ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, n. 5, p. 281–285, 1993. Elsevier. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014181309390027J?via%3Dihub>>. Acesso em: 28/12/2018.

ROBERTS, M.; MOHAMMED, Y.; PASTORE, M.; et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, v. 247, p. 86–105, 2017. Elsevier. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916306149>>. Acesso em: 3/12/2018.

SANTOS, J. E. DOS; SOARES, J. DA P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 242–249, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282003000400009&lng=pt&tlng=pt>. .

SCARIOTI, G. D.; LUBAMBO, A.; FEITOSA, J. P. A.; et al. Nanocapsule of cationic liposomes obtained using “in situ” acrylic acid polymerization: Stability, surface charge and biocompatibility. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 267–272, 2011. Elsevier. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511002864>>. Acesso em: 3/12/2018.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. **European Commission**, v. SCCS/1358, n. June, p. 1–14, 2010.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, n. 2, p. 123–140, 1997.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Infrared Spectrometry. **Analytical Chemistry**, 2005.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 738–746, 1999.

SINHA, V. .; SINGLA, A. .; WADHAWAN, S.; et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1–2, p. 1–33, 2004. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517304000225?via%3Dihub>>. Acesso em: 19/11/2018.

SMITH KORSHOLM, K.; AGGER, E. M.; FOGED, C.; et al. The adjuvant mechanism of cationic dimethyldioctadecylammonium liposomes. **Immunology**, v. 121, n. 2, p. 216–226, 2007.

SZOKA, F.; PAPAHA DJOPOULOS, D. Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). **Annual Review of Biophysics and**

Bioengineering, v. 9, n. 1, p. 467–508, 1980. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bb.09.060180.002343>>. .

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 145–160, 2005.

TSIRIGOTIS-MANIECKA, M.; GANCARZ, R.; WILK, K. A. Preparation and characterization of sodium alginate/chitosan microparticles containing esculin. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 510, p. 22–32, 2016. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775716306677>>. Acesso em: 21/5/2018.

VALENTA, C.; AUNER, B. G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 279–289, 2004. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641104000931>>. Acesso em: 10/10/2018.

VANDERKOOI, J. M.; CALLIS, J. B. Pyrene. Probe of lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes. **Biochemistry**, v. 13, n. 19, p. 4000–4006, 1974.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n. 1–2, p. 141–151, 2003.

VILLIERS, M. M. DE; OTTO, D. P.; STRYDOM, S. J.; LVOV, Y. M. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 9, p. 701–715, 2011. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X11001311>>. Acesso em: 4/12/2018.

WASAN, E. K.; REIMER, D. L.; BALLY, M. B. Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-induced damage when complexed to cationic liposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 4, p. 427–433, 1996.

WIECHERS, J. W. The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs. , , n. August, 1989.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 128–137, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.032>>. .

WOODLE, M. C.; MATTHAY, K. K.; NEWMAN, M. S.; et al. Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1105, n. 2, p. 193–200, 1992. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000527369290194Q?via%3Dihub>>. Acesso em: 19/11/2018.

YAROSH, D. B. Liposomes in investigative dermatology. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 17, n. 5, p. 203–12, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11555329>>. .

ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527–530, 2003.

ANEXO I – CALIBRAÇÃO DAS CÉLULAS DE FRANZ

| Célula | Peso vazio (g) | Peso cheio (g) | Massa (g) | Volume (mL) |
|---------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------------------|
| 91607 | 41,380 | 47,491 | 6,111 | 6,0996 |
| 91681 | 35,336 | 41,327 | 5,991 | 5,9798 |
| 91680 | 37,608 | 43,808 | 6,200 | 6,1884 |
| 91610 | 41,865 | 47,659 | 5,794 | 5,7832 |
| 91614 | 41,574 | 47,548 | 5,974 | 5,9628 |
| 91415 | 40,967 | 46,836 | 5,869 | 5,8580 |
| 91416 | 42,106 | 47,917 | 5,811 | 5,8001 |
| 91414 | 41,238 | 46,970 | 5,732 | 5,7213 |
| 91608 | 41,291 | 47,464 | 6,173 | 6,1615 |
| 91612 | 42,556 | 48,268 | 5,712 | 5,7013 |
| 91611 | 41,104 | 47,101 | 5,997 | 5,9858 |
| 91683 | 36,278 | 42,426 | 6,148 | 6,1365 |
| | | | Média | 5,948 |